

ISOLASI, KARAKTERISASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER BAKTERI ASAM LAKTAT DARI LIMBAH PEMBUATAN DANGKE ASAL KABUPATEN ENREKANG



SKRIPSI

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Meraih Gelar Sarjana Sains
Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar

Oleh:

TIAS PRADITYA PUTRA
NIM. 60300111064

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI ALAUDDIN MAKASSAR
2015

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Mahasiswa yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tias Praditya Putra
NIM : 60300111064
Tempat/Tanggal Lahir : Rappang/ 23 November 1993
Jurusan : Biologi
Fakultas : Sains dan Teknologi
Alamat : Perum Katangka Blok A No. 12 Makassar
Judul : Isolasi, Karakterisasi Dan Identifikasi Molekuler
Bakteri Asam Laktat Dari Limbah Pembuatan Dangke
Asal Kabupaten Enrekang.

Menyatakan dengan sesungguhnya dan penuh kesadaran bahwa skripsi ini benar adalah karya sendiri. Jika kemudian hari terbukti bahwa ia merupakan duplikat, tiruan, plagiat, atau dibuat oleh orang lain, sebagian atau seluruhnya, maka skripsi dan gelar yang diperoleh karenanya batal demi hukum.

Makassar, 25 Agustus 2015
Penyusun

Tias Praditya Putra
60300111064

PENGESAHAN SKRIPSI

Skripsi yang berjudul, “Isolasi, Karakterisasi Dan Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat Dari Limbah Pembuatan Dangka Asal Kabupaten Enrekang”, yang disusun oleh Tias Praditya Putra, NIM: 60300111064, mahasiswa Jurusan Biologi pada Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar, telah diuji dan dipertahankan dalam sidang Munaqasyah yang diselenggarakan pada hari kamis, tanggal 22 Juni 2015 M, dinyatakan telah dapat diterima sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana dalam Ilmu Sains dan Teknologi, Jurusan Biologi (dengan beberapa perbaikan).



Makassar, 25 Agustus, 2015

DEWAN PENGUJI:

Ketua	: Dr. Ir. Andi Suarda, M.Si
Sekretaris	: Dr. Mashuri Masri, S.Si., M.Kes
Munaqisy I	: Dr. Muh. Khalifah Mustami, M.Pd
Munaqisy II	: Dr. Sohra, M.Ag
Munaqisy III	: Isna Rasdianah Aziz, S.Si., M.Sc
Pembimbing I	: Hafsan, S.Si., M.Pd
Pembimbing II	: Fatmawati Nur, S.Si., M.Si



Diketahui oleh:

 Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
UIN Alauddin Makassar, 


Dr. Muh. Khalifah Mustami, M.Pd
NIP. 19710412 200003 1 1001

KATA PENGANTAR



Segala puji mulik Allah SWT, atas rahmat dan hidayah-nya yang telah dilimpahkan, sehingga Skripsi yang berjudul. **“Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat Dari Limbah Pembuatan Dangke Asal Kabupaten Enrekang”** dapat selesai. Sholawat dan salam kepada Rasulullah SAW sebagai satu-satunya uswah dan qudwah dalam menjalankan aktivitas keseharian di atas permukaan bumi ini. Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan baik dari segi bahasa, maupun sistematika penulisan yang termuat di dalamnya. Oleh karena itu, kritikan dan saran yang bersifat membangun senantiasa penulis harapkan guna penyempurnaan kelak.

Sebuah persembahan dan sembah sujud serta terima kasih yang khusus penulis persembahkan kepada Ayahanda **Drs. Aslang** dan Ibunda **Dra. Nurhayati** yang telah mencurahkan seluruh kasih sayangnya, berkorban, bekerja keras sepenuh hati membesarkan penulis hingga dapat menyelesaikan pendidikan pada bangku kuliah sehingga mendapatkan gelar Sarjan Strata Satu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini dapat selesai berkat dukungan dari berbagai pihak dengan penuh keikhlasan dan ketulusan hati. Untuk itu pada kesempatan ini pula, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. **Prof. Dr. Musafir Pababbari, M.Si** sebagai Rektor UIN Alauddin Makassar yang telah memberikan kebijakan-kebijakan demi membangun UIN Alauddin Makassar agar lebih berkualitas sehingga dapat bersaing dengan perguruan tinggi lainnya.
2. **Dr. Muhammad Khalifah Mustami, M.Pd**, sebagai Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar beserta Pembantu Dekan I, Pembantu Dekan

II, dan Pembantu Dekan III dan seluruh staf administrasi yang telah memberikan berbagai fasilitas kepada kami selama masa pendidikan.

3. **Isna Rasdianah Aziz, S.Si., M.Sc**, sebagai penguji atas masukkan serta bimbingan yang diberikan pada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. **Dr. Sohra., M.Ag**, sebagai penguji yang begitu sabar dalam mengajar penulis dan begitu lembut sehingga skripsi ini dapat selesai dengan tepat.
5. **Hafsan, S.Si., M.Pd**, sebagai pembimbing terima kasih bunda atas saran, nasehat dan masukkan selama penelitian serta dengan sabar selalu menyemangati.
6. **Fatmawati Nur, S.Si., M.Si**, sebagai Ketua Jurusan Biologi serta pembimbing terima kasih bunda saya ucapkan atas kesabaran dan nasehat serta semangat yang bunda berikan.
7. **Dr. Cut Muthiadin, S.Si., M.Si** Sekertaris Jurusan Biologi terima kasih atas semangat bunda dalam memberi ilmu dalam penyusunan skripsi.
8. **Seluruh Keluarga Jurusan Biologi serta Staf Jurusan Biologi** Fakultas Sains dan Teknologi yang telah banyak memberi arahan serta semangat pada penulis dalam menyusun skripsi.
9. **(Dr. Mashuri Masri, S.Si., M.Si, Aisyah Sijid, S.Si., M.Kes, Ulfa A Triyani, S.Si., M.Pd, Eka Sukmawati, S.Si., M.Si, Nurlaila Mapanganro, S.Pi., M.Pi, Ar. Syarif Hidayat, S.Si., M.Kes)** Dosen Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi yang telah banyak memberikan ilmu kepada penulis, sehingga penulis bisa menyelesaikan skripsi ini.
10. Keluarga Besar penulis (Dwi Yayang, Tri Angga, Dian Ayu, Alfin, Nabilla dan Zahra), serta Kakek dan Nenek tercinta yang tiada henti menguatkan, mendoakan, memotivasi, memberikan arahan kepada penulis sehingga penulis bisa berada pada situasi dan kondisi sekarang.
11. Kakak-kakak dari **Balai Besar Karantina Ikan Pengendalian Hasil dan Mutu Perikanan Kota Makassar (BBKIPM)**, yang telah memberikan arahan dan masukan pada penelitian penulis.

12. Tim Dangke Season II **Ria Anggreini, Nurwilda Kaswi, Nuraini Kusuma Wardhani, Ika Dian Rostika** dan **Nabillah Purnawijaya**, yang telah menemani dan membantu memberi semangat dan dorongan dalam menyelesaikan skripsi ini.
13. Teman-teman “**SINAPSIS**”, (Biologi Angkatan 2011) yang telah menjadi teman perjuangan dalam menggali ilmu pada Jurusan Biologi di Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
14. Teman-teman **One Frekuensi** yang selalu memberi semangat, memberi fikiran-fikiran baru, serta doa dalam menyelesaikan skripsi ini.
15. Teman Seperjuangan Terkhusus **Ria Anggreini** yang telah bersama-sama menempuh perkuliahan dari awal hingga akhir.
16. Teman-teman KKN Profesi Angkatan ke-5 Kel. Bulutana, Kab. Gowa, Terkhusus Ibu dan Bapak posko sebagai pengganti orang tua penulis selama KKN.

Terlalu banyak orang yang berjasa kepada penulis selama menempuh pendidikan di UIN Alauddin Makassar sehingga tidak sempat dan tidak muat bila dicantumkan semua dalam ruang sekecil ini. Penulis mohon maaf kepada mereka yang tidak tercantum namanya dan kepada mereka tanpa terkecuali, penulis mengucapkan banyak terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya semoga menjadi ibadah dan amal jaryah. Amin.

Makassar, 25 Agustus 2015
Penulis,

Tias Praditya Putra
60300111064

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xii
BAB I PENDAHULUAN	1-5
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Ruang Lingkup Penelitian	3-4
D. Penelitian Terdahulu	4
E. Tujuan Penelitian	5
F. Kegunaan Penelitian	5
BAB II TINJAUAN TEORITIS	6-37
A. Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat.....	6
B. Teori Tentang Bakteri Asam Laktat.....	15
C. Teori Yang Relevan Dengan Variabel	24
D. Ayat Al-Qur'an	33
E. Kerangka Fikir	37
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	38-54
A. Jenis dan Lokasi Penelitian	38
B. Populasi Sampel	38
C. Variabel Penelitian	38

	D. Defenisi Operasional Variabel	38-39
	E. Instrumen Penelitian	39-40
	F. Prosedur Kerja	40-53
	G. Alur Penelitian	54
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	55-73
	A. Hasil Penelitian	55
	B. Pembahasan	59
BAB V	PENUTUP	74
	A. Kesimpulan	74
	B. Saran	74
	DAFTAR PUSTAKA	75-83
	LAMPIRAN-LAMPIRAN	84-87
	RIWAYAT HIDUP.....	88

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1. Komposisi Primer Mix	46
Tabel 4.1. Karakteristik Dan Identifikasi Isolate T.....	56-58

DAFTAR GAMBAR

Gambar.3.1. Skema Kerja	54
Gambar 4.1. Hasil Isolasi Pada Media MRSA	55
Gambar 4.2. Hasil Pengamatan Uji Mikroskopis	55
Gambar 4.3. Hasil Elektroforesis Pada UV Transluminator	58
Gambar 4.4. Hasil Pembacaan Urutan Basa Nitrogen	59
Gambar 4.5. Prinsip Kerja Mini Column	70
Gambar 4.6. Tabel Hasil Analisis BLATS	72
Gambar 4.6. Perbandingan Urutan Basa Sampel T	73

ABSTRAK

Nama : Tias Praditya Putra
NIM : 60300111064
Judul : Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat dari Limbah Pembuatan Dangke Asal Kabupaten Enrekang

Limbah dangke merupakan produk samping dari pengolahan dangke. Limbah dangke dapat dimanfaatkan dalam pembuatan berbagai macam produk olahan bergizi salah satunya yaitu *nata de whey*. Namun, kebanyakan *whey* dimanfaatkan untuk dijadikan sebagai susu substitusi (tambahan) bagi pedet sapi perah. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui secara pasti bakteri asam laktat yang terdapat pada dangke dengan bahan dasar susu sapi menggunakan uji biokimia lalu dilanjutkan uji molekuler. Penelitian ini merupakan penelitian kualitatif yang bersifat deskriptif eksploratif untuk mengetahui secara pasti bakteri asam laktat yang terdapat pada limbah dangke dengan bahan dasar susu sapi. Isolasi selektif BAL dilakukan menggunakan media *de Man Rogosa Sharpe Agar*. Seleksi dilakukan dengan pengamatan morfologi serta pewarnaan gram. Selanjutnya dilakukan pengujian sifat biokimiawi dan uji fermentasi gula. Setelah itu dilakukan uji molekuler. Isolat bakteri yang berpotensi sebagai BAL akan menunjukkan zona bening pada media MRS Agar dan diinkubasi selama 24 jam. 1 isolat yang diperoleh merupakan BAL yang setelah dilakukan uji molekuler terindikasi sebagai *Pediococcus acidactilici*.

Kata kunci : Limbah Dangke, Susu Sapi, Bakteri Asam Laktat, Karakterisasi dan Uji Molekuler.

ABSTRACT

Name : Tias Praditya Putra
NIM : 60300111064
Title : Isolation, Molecular Characterization and Identification of Lactic Acid Bacteria from waste Manufacture Dangkein Enrekang District

Dangke waste is a by product of processing dangke. Dangke waste can be utilized in the manufacture of a wide range of processed products nutritious one of them is nata de whey. However, most of the whey used to be used as a milk substitute (optional) for a dairy calf. The purpose of this study was to determine with certainty the lactic acid bacteria contained in dangke with cow dairy ingredients using biochemical tests and molecular test continued. This research is qualitative descriptive exploratory to know for certain lactic acid bacteria contained in the waste dangke with cow dairy ingredients. BAL was performed using selective isolation media de Man ROGOSA Sharpe Agar. Selection is done by observing the morphology and gram staining. Further testing and biochemical properties of sugar fermentation test. After the molecular test. Bacterial isolates potentially as BAL will demonstrate clear zone in order MRS media and incubated for 24 hours. 1 isolates obtained are the following BAL molecular test is indicated as *Pediococcus acidactilici*.

Keywords: Waste Dangke, Cow's Milk, Lactic Acid Bacteria, Characterization and Molecular Test.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Peran pangan lokal sangat strategis dan penting sehingga perlu dilestarikan eksistensinya. Salah satu pangan lokal di Sulawesi Selatan yang khas adalah dangke. Panganan ini dikonsumsi oleh sebagian besar masyarakat Sulawesi Selatan khususnya di kabupaten Enrekang. Dangke adalah produk olahan susu khas Indonesia yang dibuat secara tradisional oleh masyarakat di kabupaten Enrekang, Sulawesi Selatan. Produk ini dihasilkan melalui pemanasan susu segar yang ditambahkan larutan getah pepaya sehingga susu membentuk gumpalan (*curd*) dan cairan (*whey*). *Curd* dan *whey* kemudian dipisahkan dengan tempurung kelapa sebagai alat penyaring sekaligus pencetak dangke, setelah memadat dangke lalu dibungkus dengan daun pisang dan siap dikonsumsi (Rahman, 2014).

Pada proses pembuatan dangke terdapat limbah cair berupa *whey* dangke. *Whey* merupakan hasil samping dari pengolahan dangke yang dihasilkan dari satu tahapan dalam proses pembuatan dangke. *Whey* tersusun atas laktosa, persenyawaan nitrogen (protein, peptida dan asam amino), abu dan lemak. Komponen utama yang terdapat dalam protein *whey* adalah β -lactoglobulin (β -lg) dan α -lactalbumin (α -la), karena kedua protein ini mempunyai proporsi berkisar 80% dari seluruh protein *whey*. Kandungan nutrisi *whey* yang masih sangat tinggi tersebut, dapat dimanfaatkan kembali menjadi berbagai macam makanan bergizi (Anita R, 2010: 1-2).

Mikroorganisme yang berkembang didalam susu selain menyebabkan susu menjadi rusak juga membahayakan kesehatan masyarakat sebagai konsumen akhir. Disamping itu penanganan susu yang tidak benar juga dapat menyebabkan daya simpan susu menjadi singkat, harga jual murah yang pada akhirnya juga akan mempengaruhi pendapatan peternak sebagai produsen susu. Kerusakan pada susu disebabkan oleh terbentuknya asam laktat sebagai hasil fermentasi laktosa oleh *E-coli*. Fermentasi oleh bakteri ini akan menyebabkan aroma susu menjadi berubah dan tidak disukai oleh konsumen. Untuk meminimalkan kontaminasi oleh mikroorganisme dan menghambat pertumbuhan bakteri pada susu agar dapat disimpan lebih lama maka penanganan sesudah pemerahan hendaknya menjadi perhatian utama peternak. Salah satu cara yang dapat ditempuh untuk mencegah kerusakan pada susu adalah dengan cara pemanasan (*pasteurisasi*) baik dengan suhu tinggi maupun suhu rendah yang dapat diterapkan pada peternak. Dengan pemanasan ini diharapkan akan dapat membunuh bakteri patogen yang membahayakan kesehatan manusia dan meminimalisasi perkembangan bakteri lain, baik selama pemanasan maupun pada saat penyimpanan (Eniza S, 2004: 1).

Mikroba yang biasa terdapat dalam susu adalah dari genus *Streptococcus*, *Aerobacter*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus* dan *Pseudomonas*. Dari beberapa jenis mikroba tersebut, ada yang memberikan dampak positif maupun dampak negatif (Volk *et al.*, 1993, 207).

Besar kemungkinan bagi bakteri untuk tumbuh dan berkembang biak pada limbah pembuatan dangke, baik sebagai kontaminan maupun sebagai flora normal yang memiliki potensi sebagai bakteri baik misalnya bakteri probiotik yang

menguntungkan bagi kesehatan. Untuk dapat memanfaatkan bakteri secara khusus demi kepentingan makhluk hidup lainnya utamanya manusia, perlu diketahui sifat-sifat bakteri yang diperoleh. Ada beberapa cara yang dapat dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri, salah satunya yaitu dengan menggunakan pengujian biokimia dan morfologinya. Cara ini dapat memberikan beberapa gambaran sifat dan ciri-ciri morfologis dan fisiologis bakteri yang diperoleh. Kelemahan dari cara ini terletak pada sifat bakteri yang diperoleh. Hal ini dikarenakan banyak bakteri yang memiliki bentuk dan sifat-sifat kimia yang sama. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji molekuler untuk mengetahui spesies bakteri yang diperoleh secara spesifik. Selain itu, DNA/RNA bakteri yang memiliki sifat yang diinginkan dapat diisolasi untuk melakukan rekayasa genetik. Setelah melakukan pengujian morfologi dan biokimia, selanjutnya harus dilakukan identifikasi molekuler. Hal inilah yang melandasi dilakukannya penelitian ini.

B. Rumusan Masalah

Bakteri asam laktat (BAL) apa yang terdapat pada limbah pembuatan dangke dan bagaimana susunan genetik yang dimiliki oleh bakteri asam laktat (BAL) dari limbah pembuatan dangke?

C. Ruang Lingkup Penelitian

1. Limbah dangke yang dikirim dari kabupaten enrekang menjadi objek penelitian diambil oleh peneliti di rumah produksi dengan bahan dasar susu sapi dan getah

pepaya yang diperoleh dari tempat rumah industri dangke di Kabupaten Enrekang.

2. BAL merupakan jenis bakteri yang memiliki ketahanan terhadap asam lambung. Pewarnaan gram dan uji biokimia serta menggunakan metode identifikasi molekuler yang digunakan untuk mengetahui jenis bakteri asam laktat yang ada pada limbah pembuatan dangke.
3. Bakteri Asam Laktat merupakan bakteri yang bermanfaat dan digunakan dalam industri besar sebagai bakteri fermentasi, bakteri pada umumnya memiliki sifat kimia yang hampir sama sehingga dengan uji molekuler dapat dilakukan identifikasi sehingga peneliti dapat mengetahui bakteri asam laktat yang telah ditemukan di limbah pembuatan dangke.

D. Penelitian Terdahulu

Adapun penelitian terdahulu yang menjadi acuan dalam melakukan penelitian ini adalah penelitian mengenai Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dangke Asal Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan oleh Jannatin Al Faafa yang menunjukkan bahwa spesies BAL dari dangke adalah *Pediococcus pentosaceus* termasuk BAL mesofilik yang mampu bertahan pada suhu 30°C hingga 45°C dan kondisi garam yang tinggi yaitu NaCl 6.5% (Faafa Jannatin, 2014). Selain itu, Fatma dkk melakukan penelitian mengenai pengoptimasian kondisi fermentasi *whey* limbah dangke sebagai produk minuman. Mereka menghasilkan produk minuman fermentasi komersial dengan karakteristik kandungan asam laktat 0,58%, viskositas 0,21 poise dan pH 3,7. Karakteristik tersebut diperoleh pada kondisi inkubasi 16 jam, menggunakan level

inokulum 5% *Lactobacillus acidophilus* (Fatma, 2012). Penelitian terbaru yang dilakukan oleh Dewi Paramita Sari, berhasil mengidentifikasi BAL dari dangke. Bakteri yang berhasil diidentifikasi yaitu bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan *Lactobacillus fermentum* (Paramita, 2013).

E. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bakteri asam laktat yang terdapat pada limbah pembuatan dangke melalui pengamatan morfologi, pewarnaan gram dan uji biokimia serta menggunakan metode identifikasi molekuler dan untuk mengetahui susunan basa nukleotida yang dimiliki bakteri asam laktat yang terdapat pada limbah pembuatan dangke.

F. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diharapkan pada penelitian yang telah dilakukan ini yaitu:

1. Sebagai informasi pada masyarakat tentang jenis bakteri asam laktat yang terkandung dalam limbah pembuatan dangke.
2. Sebagai bahan informasi mengenai sifat-sifat bakteri yang terdapat di limbah dangke untuk menghasilkan produk yang bernilai gizi tinggi.
3. Sebagai sumber informasi dan bahan relevansi bagi penelitian-penelitian selanjutnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat

Biologi molekular dapat didefinisikan sebagai ilmu yang mempelajari fungsi dan organisasi jasad hidup (organisme) ditinjau dari struktur dan regulasi molekular unsur atau komponen penyusunnya. Istilah biologi molekular pertama kali digunakan oleh William Astbury pada tahun 1945 untuk menjelaskan struktur kimia dan fisika makromolekul biologis. Dengan perkembangan biologi modern, cakupan biologi molekular kini tidak lagi hanya sebatas struktur kimia atau fisika, melainkan juga fungsi dan organisasi makromolekul tersebut di dalam jasad hidup serta interaksi antar komponen selular. Beberapa penulis membuat batasan mengenai biologi molekular secara lebih sempit, yaitu suatu ilmu yang mempelajari organisasi, aktivitas dan regulasi gen pada aras molekul. Termasuk di dalam batasan ini adalah kajian mengenai replikasi DNA, transkripsi, translasi, rekombinasi, dan translokasi (Yuwono, 2005).

Charles Darwin dengan teori evolusinya kembali mengulas secara lugas tentang seleksi alam selama proses evolusi berlangsung, proses evolusi terjadi bukan hanya karena seleksi alam akibat perubahan lingkungan saja tetapi juga akibat perubahan di tingkat selular maupun molekular dari suatu organisme. Mutasi pada urutan DNA dapat mempengaruhi ekspresi dari protein, baik struktur atau fungsi protein bisa berubah akibat mutasi tersebut (Fatchiyah, 2011: 7).

Segitiga trinitas genetik molekular terdiri dari DNA, RNA dan protein yang telah kita kenal sebagai dogma sentral. Molekul DNA sebagai pembawa materi genetik bagi hampir semua makhluk hidup kecuali beberapa virus. DNA diterjemahkan dalam bentuk mRNA kemudian pada proses translasi untuk produksi protein yang fungsional (Fatchiyah, 2011: 8).

Komponen sel jasad hidup terdiri atas bermacam-macam molekul. Berdasarkan atas ukurannya yaitu molekul kecil dan makromolekul. Molekul kecil memiliki berat kurang dari seribu seperti asam-asam amino, nukleotida dan monosakarida, makromolekul mempunyai berat molekul yang sangat tinggi seperti asam nukleat, protein dan polisakarida. Makromolekul mempunyai peranan yang sangat penting bagi jasad hidup, sifat genetik jasad hidup tersimpan di dalam untaian DNA yang merupakan polimer nukleotida (Yuwono, 2005: 22).

Kromosom merupakan struktur seperti benang pada nukleus sel eukariotik yang nampak pada saat sel mulai membelah, ditemukan pada awal abad ke-19. Pada organisme diploid, kromosom berjumlah diploid (2 set) pada setiap selnya. Gen merupakan bagian unit hereditas suatu organisme hidup yang terdapat di dalam kromosom, gen dikode dalam genetik pada organisme hidup sebagai molekul DNA, RNA (Fatchiyah, 2011: 12).

DNA merupakan molekuler penyusun kromosom yang tersusun atas basa-basa nukleotida, gula pentosa, dan deoksiribosa. Urutan nukleotida DNA terdiri dari daerah yang mengkode gen yang disebut sebagai **ekson**, daerah bukan pengkode (non-coding) DNA yang disebut **intron**, regulator gen, dan daerah urutan berulang seperti mikrosatelit, telomer, variabel number tandem repeat (VNTR), *sequence-*

tagged site (STS), dan *single nucleotide polymorphism* (SNP). Selain itu, ada pula metode dasar untuk manipulasi gen dan mengidentifikasi mutasi, polimorfisme, serta kajian evolusi baik dengan teknik *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) maupun amplifikasi DNA dengan *polymerase chain reaction* (PCR). Kedua teknik ini juga digunakan untuk mengidentifikasi kelainan penyakit. Selain digunakan untuk analisis polimorfisme, hasil amplifikasi juga dapat digunakan untuk pembuatan DNA rekombinan kloning dan sekuensing (Fatchiyah, 2011).

Beberapa teknik analisis keanekaragaman genetik seperti RAPD, RFLP, dan DGGE membutuhkan amplifikasi daerah genom tertentu dari suatu organisme. Amplifikasi ini membutuhkan primer spesifik (sekuen oligonukelotida khusus) untuk daerah tersebut. Primer biasanya terdiri dari 10-20 nukleotida dan dirancang berdasarkan daerah konservatif dalam genom tersebut. Makin panjang primer, makin spesifik daerah yang diamplifikasi. Jika suatu kelompok organisme memang berkerabat dekat, maka primer dapat digunakan untuk mengamplifikasi daerah tertentu yang sama dalam genom kelompok tersebut. Beberapa faktor seperti konsentrasi DNA contoh, ukuran panjang primer, komposisi basa primer, konsentrasi ion Mg, dan suhu hibridisasi primer harus dikontrol dengan hati-hati agar dapat diperoleh pita-pita DNA yang utuh dan baik. Keberhasilan teknik ini lebih didasarkan kepada kesesuaian primer dan efisiensi dan optimasi proses PCR. Primer yang tidak spesifik dapat menyebabkan teramplifikasinya daerah lain dalam genom yang tidak dijadikan sasaran atau sebaliknya tidak ada daerah genom yang teramplifikasi. Optimasi PCR juga diperlukan untuk menghasilkan karakter yang diinginkan. Optimasi ini menyangkut suhu denaturasi dan *annealing* DNA dalam mesin PCR.

Suhu denaturasi yang rendah dapat menyebabkan belum terbukanya DNA utas ganda sehingga tidak dimungkinkan terjadinya polimerisasi DNA baru. Proses penempelan primer pada utas DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum, sebab suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak terjadi atau sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom yang bukan sisi homolognya; akibatnya dapat teramplifikasi banyak daerah tidak spesifik dalam genom tersebut. Suhu penempelan (*annealing*) ini ditentukan berdasarkan primer yang digunakan yang dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer. Suhu penempelan ini sebaiknya sekitar 5°C di bawah suhu leleh. Secara umum suhu leleh (T_m) dihitung dengan rumus $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)^\circ\text{C}$ (Rybicky, 1996).

PCR-RAPD merupakan salah satu teknik molekuler berupa penggunaan penanda tertentu untuk mempelajari keanekaragaman genetika. Dasar analisis RAPD adalah menggunakan mesin PCR yang mampu mengamplifikasi sekuen DNA secara *in vitro*. Teknik ini melibatkan penempelan primer tertentu yang dirancang sesuai dengan kebutuhan. Tiap primer boleh jadi berbeda untuk menelaah keanekaragaman genetik kelompok yang berbeda. Penggunaan teknik RAPD memang memungkinkan untuk mendeteksi polimorfisme fragmen DNA yang diseleksi dengan menggunakan satu primer arbitrase, terutama karena amplifikasi DNA secara *in vitro* dapat dilakukan dengan baik dan cepat dengan adanya PCR. Penggunaan penanda RAPD relatif sederhana dan mudah dalam hal preparasi. Teknik RAPD memberikan hasil yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik molekuler lainnya. Teknik ini juga mampu menghasilkan jumlah karakter yang relatif tidak terbatas, sehingga sangat membantu untuk keperluan analisis keanekaragaman organisme yang tidak diketahui

latar belakang genomnya. Pada tanaman tahunan RAPD dapat digunakan untuk meningkatkan efisiensi seleksi awal. Teknik RAPD sering digunakan untuk membedakan organisme tingkat tinggi (*eucaryote*). Namun demikian beberapa peneliti menggunakan teknik ini untuk membedakan organisme tingkat rendah (*procaryote*) atau melihat perbedaan organisme tingkat rendah melalui piranti organel sel seperti mitokondria.

Teknik PCR-RFLP merupakan teknik yang hampir sama dengan teknik RAPD pada prinsip penggunaan primernya. Untuk melihat polimorfisme dalam genom organisme digunakan juga suatu enzim pemotong tertentu (*restriction enzymes*). Karena sifatnya yang spesifik, maka enzim ini akan memotong situs tertentu yang dikenali oleh enzim ini. Situs enzim pemotong dari genom suatu kelompok organisme yang kemudian berubah karena mutasi atau berpindah karena *genetic rearrangement* dapat menyebabkan situs tersebut tidak lagi dikenali oleh enzim, atau enzim restriksi akan memotong daerah lain yang berbeda. Proses ini menyebabkan terbentuknya fragmen-fragmen DNA yang berbeda ukurannya dari satu organisme ke organisme lainnya. Polimorfisme ini selanjutnya digunakan untuk membuat pohon filogeni/dendogram kekerabatan kelompok. Teknik RFLP sering digunakan untuk mengetahui perbedaan jenis bakteri misalnya berdasarkan gen ribosomal DNA (contoh 16S-rRNA). Oleh karenanya teknik ini seringkali pula disebut ARDRA (*amplified ribosomal DNA restriction analysis*). Penggunaan teknik PCR-RFLP telah pula mampu secara mengesankan mengungkap keanekaragaman genetik mikroba yang tidak dapat dikulturkan di laboratorium. Dengan menggunakan teknik isolasi DNA dari lingkungan yang kemudian dilanjutkan dengan amplifikasi

dengan menggunakan primer spesifik untuk 16S-rRNA telah dapat diungkap adanya jenis-jenis mikroba baru. Dengan menggunakan primer tertentu, teknik ini juga dapat digunakan untuk gen-gen lain yang ada dalam contoh lingkungan.

Pemilihan DNA ribosom untuk tujuan identifikasi suatu organisme didasarkan pada:

1. Secara fungsional dan evolusioner memiliki sifat homolog dari berbagai organisme yang berbeda
2. Molekul purba dengan struktur dan sekuen nukleotida sangat konservatif
3. Sangat banyak di dalam sel
4. Cukup besar untuk memungkinkan uji statistik perbedaan-perbedaannya satu sama lain
5. Tidak ada artifak perpindahan lateral antar organisme

PCR-Analisis sekuen merupakan suatu teknik yang dianggap paling baik untuk melihat keanekaragaman hayati suatu kelompok organisme. Teknik ini berkembang setelah orang menciptakan mesin *DNA sequencer*. Pada prinsipnya polimorfisme dilihat dari urutan atau sekuen DNA dari fragmen tertentu dari suatu genom organisme. Untuk melihat keanekaragaman jenis dapat dilakukan melalui analisis sekuen gen 16S-rRNA bagi organisme prokaryota atau 18S-rRNA bagi organisme eukaryota. Perbandingan sekuen rRNA merupakan alat yang baik untuk mendeduksi hubungan filogeni dan evolusi di antara organisme *bacteria*, *archaeobacteria*, dan eukaryot (Weisburg *et al.*, 1991). Gen-gen penghasil enzim tertentu misalnya dapat juga dibandingkan berdasarkan sekuen mereka. Saat ini basis data (*data-base*) untuk banyak gen 16SrRNA dan 18S-rRNA tersedia dan disimpan

misalnya dalam Gene-Bank, dan dapat diakses misalnya melalui <http://www.ebi.ac.uk>. Demikian juga untuk banyak gen spenghasil enzim penting dan beberapa sekuen lainnya.

Teknik analisis PCR-DGGE merupakan teknik yang mirip dengan RAPD ataupun RFLP, hanya saja primer yang digunakan misalnya primer GC *clamp*. Elektroforesis yang dilakukan menggunakan gel poliakrilamida dengan gradien urea yang ditambah dengan formamida. Pemisahan dilakukan tanpa enzim restriksi dan sekuen bukan berdasarkan berat molekul. Teknik ini menggunakan dasar perbedaan stabilitas produk PCR. Dengan demikian sangat tergantung dari jumlah ikatan hidrogen yang ada dalam DNA tersebut.

MFLPP ada prinsipnya semua teknik pemisahan DNA, misalnya pada RFLP dan RAPD, menggunakan suatu teknik elektroforesis medan listrik tetap dan satu arah (konfigurasi horizontal) dengan media agarose atau akrilamid. Gel agarose memiliki kapasitas pemisahan yang lebih rendah dibandingkan dengan gel akrilamid, tetapi memiliki spektrum pemisahan yang lebih besar. Teknik elektroforesis gel agarose konvensional ini biasanya digunakan untuk memisahkan fragmen DNA dengan ukuran relatif kecil dengan ukuran sekitar 200 bp sampai kira-kira 50 kb. Fragmen dengan ukuran di atas 50 kb tidak lagi dapat dipisahkan dengan baik dengan menggunakan teknik ini. Fragmen-fragmen ini akan bergerak dalam kecepatan yang sama dalam gel agarosa. Batas kemampuan linier tersebut melampaui ukuran pori-pori gel. Agar dapat terpisah fragmen harus bergerak dari ujung ke ujung (*end-on*). Masalah ini akhirnya dapat diatasi oleh Schwartz dan Cantor (1984) yang memperkenalkan teknik *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE). Dengan teknik ini

molekul DNA secara periodik merubah arah migrasi selama elektroforesis. Beberapa teknik PFGE telah diperkenalkan, yaitu *field inversion gel electrophoresis* (FIGE), *contour clamped homogenous electric field* (CHEF), dan *programmable, autonomously controlled electrode gel electrophoresis* (PAGE). Berbeda dengan teknik elektroforesis lainnya, yang sering mengisolasi DNA dalam cairan, teknik PFGE ini membutuhkan DNA yang kurang lebih utuh. Isolasi DNA dalam cairan seringkali menyebabkan DNA terpotong-potong dengan ukuran rata-rata kurang dari 1000 kb. Untuk keperluan PFGE genom suatu organisme biasanya diisolasi utuh dengan cara memerangkap sel dalam agarose. Pemecahan dan pemurnian DNA selanjutnya dilakukan secara *in situ*. Teknik identifikasi dengan PFGE atau MFLP ini sangat diskriminatif dalam membedakan strain suatu kelompok bakteri dengan strain bakteri lainnya. Oleh karenanya teknik ini sering digunakan untuk melihat perbedaan strain-strain bakteri spesies yang sama.

Beberapa tahun terakhir ini kita telah melihat sebuah perkembangan besar dalam penerapan alat molekuler untuk mengidentifikasi mikroba dan menganalisis aktivitas mereka. Alat-alat ini semakin diterapkan pada strain bakteri asam laktat (BAL), termasuk yang digunakan dalam fermentasi maupun yang dipasarkan sebagai probiotik. Alat ini dapat digunakan untuk identifikasi dan analisis aktivitas bakteri tersebut. Kebanyakan prinsip dari alat ini didasarkan pada urutan 16S ribosomal DNA dan mengeksploitasi baik secara hibridisasi atau teknik PCR. Selanjutnya, genom parsial berbagai BAL dan bifidobacteria telah ditentukan dan menawarkan pendekatan untuk menganalisis mikroba berbasis aktivitas bakteri asalkan mekanisme kerja mereka diketahui. Semua pendekatan ini dapat digunakan untuk penyaringan

dan pemilihan BAL, menilai peran mereka dalam fermentasi dan pengembangan rasa produk fermentasi. Aspek tambahan dari BAL probiotik termasuk kelangsungan hidup dan vitalitas mereka selama pengolahan dan analisis keberadaan dan kinerjanya dalam saluran pencernaan (Kaouther, 2007).

Telah banyak dihasilkan revolusi dalam pengembangan dunia mikrobiologi yang cepat dan otomatis dapat menentukan spesies bakteri yang dilihat dari segi molekulnya. Metode deteksi untuk berbagai spesies bakteri asam laktat (BAL) yang berhubungan dengan makanan dan produk susu. Saat ini banyak strain seperti BAL yang dianggap sebagai probiotik. Metode berbasis genom berguna dalam mengidentifikasi bakteri sebagai pelengkap atau alat alternatif untuk metode *phenotypical*. Selama beberapa tahun, metodologi identifikasi menggunakan primer yang menargetkan pada urutan yang berbeda, seperti 16S ribosomal RNA (rRNA) encoding gen, yang menghubungkan gen 16S rRNA dengan 23S-wilayah spacer, pada 23S rRNA-encoding, recA dengan ldhD; acak diperkuat DNA polimorfik, pembatasan panjang fragmen polymorphism, denaturasi elektroforesis gel gradien, gradien suhu gel elektroforesis, analisis amplifikasi rDNA pembatasan, analisis enzim restriksi, rRNA, gel elektroforesis bidang pulsa dan amplifikasi fragmen polimorfisme yang panjang telah memainkan peran penting dalam bidang bakteri probiotik. Oleh karena itu, hal ini memberikan gambaran beberapa polimerase cepat dan handal. Reaksi berantai berbasis metode molekuler yang digunakan untuk mengidentifikasi dan membedakan spesies yang terkait erat dan strain BAL terkait dengan makanan dan industri (Mohania, 2008).

B. Teori Tentang Bakteri Asam Laktat

Bakteri asam laktat (BAL) secara fisiologis dikelompokkan sebagai bakteri gram positif, bentuk *coccus* atau batang yang tidak berspora dengan asam laktat sebagai produk utama fermentasi karbohidrat. BAL pada proses fermentasi karbohidrat dapat menghasilkan asam laktat yang dapat menurunkan pH. Penurunan nilai pH dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain, terutama bakteri patogen. Bakteri asam laktat merupakan salah satu mikrobiota alami yang banyak dimanfaatkan sebagai agensia fermentasi. Proses fermentasi oleh bakteri asam laktat sangat bergantung pada aktivitas dan proliferasi bakteri-bakteri penghasil asam laktat. Organisme pembentuk asam laktat terbagi dua spesies, yaitu spesies homofermentatif yang mampu mengubah 95% heksosa menjadi asam laktat, spesies heterofermentatif merupakan grup yang memproduksi asam laktat dalam jumlah sedikit dan produk yang dihasilkan yaitu etil alkohol, asam asetat, asam format dan karbondioksida. BAL juga diketahui merupakan agen pencegah hiperkolesterolemia yang dicerminkan pada peningkatan kolesterol HDL dan Penurunan kolesterol LDL pada hewan coba (Sumarsi S & Yudiarti T Dkk, 2009: 2)

BAL merupakan salah satu bakteri yang diperoleh selama proses fermentasi karbohidrat. Bakteri ini dapat menghasilkan asam laktat, asam asetat, etanol dan CO₂. Aktifitas bakteri ini dapat menyebabkan penurunan pH dimana bakteri patogen tidak dapat tumbuh pada pH yang rendah dan meningkatkan nilai sehat terhadap makanan atau minuman yang difermentasi. Secara umum BAL didefinisikan sebagai kelompok bakteri Gram positif, tidak menghasilkan spora, berbentuk bulat atau batang.

Beberapa jenis bakteri asam laktat ada yang digolongkan ke dalam bakteri probiotik, seperti *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, dan *Streptococcus*. BAL yang digolongkan ke dalam probiotik harus memiliki aktifitas antimikroba terhadap beberapa mikroorganisme tertentu, toleran terhadap asam lambung, dan tidak berbahaya (Sari M.Yuni Nurisva, Syukur S & Jamsari, 2013: 82).

BAL merupakan golongan mikroorganisme yang bermanfaat dengan sifat tidak toksik bagi inangnya dan mampu menghasilkan senyawa yang dapat membunuh bakteri pathogen. Untuk menjadi probiotik, BAL harus memiliki aktivitas antimikroba dengan memproduksi substansi penghambat seperti asam laktat, diasetil, hidrogen peroksida (H_2O_2), karbondioksida (CO_2) dan senyawa peptida antimikroba yang bernama bakteriosin. Senyawa-senyawa ini tidak hanya dapat menghambat pertumbuhan bakteri tetapi dapat mempengaruhi metabolisme bakteri atau produksi toksin. BAL dapat diberikan pada hewan maupun manusia. Salah satu contoh hewan yang dapat diberikan BAL adalah orangutan. Orangutan merupakan spesies prioritas (*flagship species*) sebagai lambang konservasi yang termasuk kedalam jenis satwa liar dilindungi dengan status terancam punah (*Endangered Spesies*) sesuai dengan IUCN Red List tahun 2002. Salah satu penyebab kepunahan orangutan yaitu infeksi bakteri patogen. Bakteri patogen yang sering menginfeksi orangutan yaitu *Shigella*, *E. coli* dan *Salmonella*. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menguji aktivitas antimikroba BAL yang diisolasi dari feses orangutan (*Pongo pygmaeus*) dan mengetahui *Minimum Inhibitory Consentration* (MIC) BAL terhadap bakteri enterik patogen *Escherichia coli*, *Salmonella* dan *Shigella dysentrieae* secara *in vitro* (Septiarini, 2008).

Bakteri asam laktat (BAL) telah lama digunakan sebagai probiotik, termasuk didalamnya jenis *Lactobacillus bulgaricus*, *L. Acidophilus*, *L. Sporogenes*, *L. Casei*, *L. plantarum* dan *Streptococcus*. Faktor-faktor yang mempengaruhi ketahanan hidup dan pertumbuhan dalam usus digunakan dalam menentukan strain BAL yang berpotensi sebagai probiotik. Stress bakteri probiotik di mulai dari lambung, dimana bakteri ini harus mampu bertahan terhadap pH yang sangat rendah. Waktu yang dibutuhkan bakteri mulai masuk sampai keluar lambung adalah 90 menit. Setelah bakteri probiotik berhasil melalui lambung, mereka akan memasuki saluran usus bagian atas yang merupakan tempat garam empedu disekresikan. Galur-galur BAL dari spesies yang sama serta diisolasi dari sumber yang sama, memiliki keragaman pada toleransi terhadap garam empedu (Mujnisa, 2013).

Bakteri asam laktat memanfaatkan gula sebagai sumber energi, pertumbuhan dan menghasilkan metabolit berupa asam laktat selama proses fermentasi. Mikroba akan merombak senyawa karbon (sukrosa/gula) menjadi energi untuk pertumbuhan dan asam laktat sebagai metabolitnya. Mikroba membutuhkan gula untuk aktivitas metabolisme dan perkembangbiakan sel. Hal tersebut berkaitan dengan peningkatan jumlah sel bakteri, dimana semakin banyak sel bakteri yang ada, maka sukrosa akan semakin banyak digunakan untuk metabolisme sel. Peningkatan jumlah bakteri menyebabkan peningkatan perombakan senyawa gula yang ada pada medium menjadi asam-asam organik (Maryana, 2014).

BAL mempunyai peranan esensial hampir dalam semua proses fermentasi makanan dan minuman. Salah satu peran utama bakteri ini adalah untuk mengawetkan bahan makanan dengan menghasilkan sebagian besar asam laktat

(bakteri homofermentatif), asam asetat, etanol dan CO₂ (bakteri heterofermentatif) serta bakteriosin. BAL dapat menurunkan pH suatu makanan atau minuman, penurunan pH disebabkan karena adanya asam-asam organik yang dihasilkan oleh BAL. Selain asam organik, BAL juga dapat menghasilkan senyawa antimikroba lain seperti bakteriosin dan hidrogen peroksida. Bakteriosin merupakan substansi protein yang memiliki berat molekul kecil dan dapat berperan sebagai bakterisida. Bakteriosin yang dihasilkan oleh BAL banyak dimanfaatkan dalam industri produk fermentasi karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* dan *V.Cholera* (Sari, 2012: 14 & 17).

Adanya mikroba yang menguntungkan yang secara alami ada dalam usus memberi peluang (kemungkinan) untuk mengisolasi dan memperbanyaknya, yang kemudian dimanfaatkan kembali ke sistem pencernaan serta dipakai sebagai probiotik. Agar probiotik efektif, mikroorganisme tersebut harus dapat aktif dalam berbagai kondisi lingkungan yang berbeda dan tetap hidup dalam berbagai bentuk. Mikroba tersebut harus memenuhi beberapa kriteria, antara lain dapat diproduksi secara massal, tetap stabil dalam waktu lama dalam kondisi penyimpanan dan di lapang, dapat bertahan hidup (akan lebih baik kalau dapat tumbuh) di dalam saluran pencernaan dan memberikan dampak yang menguntungkan pada inang. Bertitik tolak dari pemikiran tersebut, banyak penelitian dilakukan untuk mengkaji peluang penggunaan mikroba atau metabolitnya sebagai imbuhan pakan untuk menggantikan AGP yang diketahui mempunyai dampak negatif, baik bagi ternak ruminansia, nonruminansia, perikanan maupun manusia (Kompiang, 2009).

BAL diklasifikasikan menjadi empat kelas yaitu genus *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, dan *Pediococcus*. Klasifikasi tersebut lebih didasarkan pada ciri morfologi, tipe fermentasi, kemampuan untuk tumbuh pada suhu yang berbeda, sifat stereo spesifik (D atau L laktik), serta toleransi terhadap asam dan basa. Asam-asam organik yang dihasilkan BAL dapat menghentikan pertumbuhan bakteri patogen baik bakteri gram negatif maupun gram positif, asam-asam lipofilik seperti asam laktat dan asetat dalam bentuk tidak terdisosiasi dapat menembus sel mikroba dan pada pH intraseluler yang lebih tinggi, berdisosiasi menghasilkan ion-ion hidrogen dan mengganggu fungsi metabolik esensial seperti translokasi substrat dan fosforilasi oksidatif, dengan demikian mereduksi pH intraseluler. Bakteri asam laktat menghasilkan hidrogen peroksida dengan adanya oksigen. Pembentukan hidrogen peroksida dikatalisis oleh flavoprotein sitoplasmik (FAD) NADH oksidase yang sangat aktif dengan tujuan untuk menghilangkan kelebihan elektron dari NADH sehingga berkompetisi dengan laktat dehidrogenase untuk NADH (terbentuk selama pemecahan glukosa) tetapi tanpa produksi ATP (Kusumawati N, 2000: 16-17).

Sampai saat ini, telah disepakati bahwa mikrobiota dari sistem pencernaan merupakan satu sistem ekologi yang sangat esensial untuk kesehatan. Keseimbangan ekologi tersebut selalu mendapat tekanan dari berbagai faktor, yang sering memberi kesempatan bagi mikroba yang kurang diharapkan untuk berkembang biak sehingga memberikan dampak negatif bagi kesehatan maupun kinerja ternak. Disepakati bahwa pengobatan dengan antibiotik akan mengganggu stabilitas ekologi mikrobiota usus, sehingga menurunkan pertumbuhan dan daya tahan terhadap infeksi, terutama setelah pengobatan dihentikan (Kompang, 2009).

BAL yaitu jenis bakteri yang mampu memetabolisme laktosa untuk menghasilkan asam laktat. BAL memegang peranan penting dalam proses fermentasi. Fermentasi asam laktat pada umumnya terjadi dalam kondisi kekurangan (*anaerobic fakultatif*) atau tanpa oksigen sama sekali (*obligat anaerob*). BAL banyak terdapat pada produk susu karena ketersediaan laktosa sebagai substrat utama untuk proses fermentasi. Aplikasi BAL dalam produk makanan dan minuman sudah cukup banyak dilakukan, terutama pada produk-produk pangan fungsional. Tujuan penggunaan BAL ini pada umumnya adalah untuk menambah nilai fungsional produk yaitu fungsi perlawanan terhadap bakteri patogen dalam saluran pencernaan (probiotik) (Maryana, 2014).

Bakteri probiotik adalah bakteri yang dapat meningkatkan kesehatan manusia. Bakteri probiotik mampu bertahan hidup selama pengolahan, penyimpanan dan di dalam ekosistem saluran pencernaan, meskipun terdapat berbagai rintangan seperti air liur, asam lambung dan asam empedu. Selain itu bakteri probiotik dapat berkembang biak, tidak beracun serta tidak patogen (Sunarlim, 2009: 71). Sedangkan bakteri prebiotik adalah bahan pangan yang tidak tercerna di dalam tubuh atau *nondigestible food ingredient* yang berfungsi memicu aktivitas serta pertumbuhan yang selektif terhadap satu jenis atau lebih bakteri penghuni kolon yang bermanfaat (Gibson *et al.* 2000, 3915-3955).

Hampir semua bangsa di dunia mempunyai makanan tradisional, yang pembuatan dan pengawetannya menggunakan mikroba. Pada umumnya, mereka menggunakan bakteri asam laktat saja atau dikombinasikan dengan mikroba lainnya. Di Indonesia, makanan yang menggunakan mikroba antara lain adalah tape, asinan,

bakasang, tempe, dan oncom. Dengan demikian, konsumsi mikroba dalam bentuk hidup maupun metabolitnya untuk kesehatan telah dilakukan oleh manusia sejak zaman dahulu. Namun apakah mereka sadar atau mengetahui manfaat mengonsumsinya, tidak diketahui dengan pasti (Kompiani, 2009).

Lactobacillus acidophilus adalah salah satu contoh bakteri yang dapat dimanfaatkan sebagai minuman probiotik. Bakteri ini bersifat Gram positif, menggunakan sumber laktosa dan bahan lain sebagai sumber nutrisinya. Bakteri yang berasal dari genus *Lactobacillus* biasanya memiliki sel yang reguler dan berbentuk batang dengan ukuran $0,5-1,2 \times 1,0-10,0 \mu\text{m}$. Pada umumnya berbentuk batang panjang, tetapi kadang-kadang hampir bulat, koloni yang terbentuk biasanya berupa rantai pendek, *fakultatif anaerob*, kadang-kadang *microaerophilic*, tumbuh kurang baik di udara, beberapa anaerob pada saat isolasi. Pertumbuhan biasanya ditingkatkan dengan penambahan 5% CO_2 . Koloni pada media agar pada umumnya 2-5 mm, cembung, buram, dan tanpa pigmen. Sel ini memerlukan media yang kaya dan kompleks (Sneath, 1986).

Lactobacillus acidophilus adalah salah satu dari beberapa bakteri dengan genus *Lactobacillus*. Bakteri ini tumbuh dengan subur pada lingkungan yang bersifat asam (pH 4-5 atau lebih rendah) dan tumbuh optimal pada suhu 45°C . *Lactobacillus acidophilus* secara alami sudah ada di dalam usus manusia dan hewan serta vagina. *Lactobacillus acidophilus* dapat mati dengan pemanasan, embun dan cahaya matahari langsung. *Lactobacillus acidophilus* juga penting pada proses fermentasi makanan, mulai dari *dairy products* sampai buah dan sayuran. Fermentasi terjadi saat bakteri memecah gula dan karbohidrat untuk memproduksi alkohol, CO_2 , dan asam laktat.

Produk sampingnya dapat menimbulkan rasa yang unik pada hasil fermentasi, sebagai pengawet dan meningkatkan pitabilitas. *Lactobacillus acidophilus* memproduksi asam laktat (dapat menghambat pertumbuhan jamur) seperti antibiotik alami dan dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Salmonella*, *Shigella*, *Salmonella faecalis* dan *E.coli*. Berdasarkan penelitian, *Lactobacillus acidophilus* efektif dalam mengurangi intoleransi laktosa, memperkuat sistem kekebalan tubuh, dan mengurangi kadar kolesterol. *Lactobacillus acidophilus* hidup sepanjang saluran pencernaan dan terdapat dalam jumlah yang sangat banyak pada usus halus (Febriasari, 2008).

Lactobacillus plantarum adalah bakteri asam laktat dari famili *Lactobacillaceae* dan genus *Lactobacillus*. Bakteri ini bersifat Gram positif, non motil dan berukuran $0,6-0,8 \mu\text{m} \times 1,2-6,0 \mu\text{m}$. Bakteri ini memiliki sifat antagonis terhadap mikroorganisme penyebab kerusakan makanan seperti *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* dan Gram negatif. *Lactobacillus plantarum* bersifat toleran terhadap garam, memproduksi asam dengan cepat dan memiliki pH ultimat 5,3 hingga 5,6 (Buckle *et al.*, 1987).

Bakteri *Lactobacillus plantarum* umumnya lebih tahan terhadap keadaan asam dan oleh karenanya menjadi lebih banyak terdapat pada tahapan terakhir dari fermentasi tipe asam laktat. Bakteri ini sering digunakan dalam fermentasi susu, sayuran dan daging (sosis). Fermentasi dari *L. plantarum* bersifat homofermentatif sehingga tidak menghasilkan gas (Buckle *et al.*, 1987). Bakteri *Lactobacillus plantarum* terutama berguna untuk pembentukan asam laktat, penghasil hidrogen peroksida tertinggi dibandingkan bakteri asam laktat lainnya dan juga menghasilkan

bakteriosin yang merupakan senyawa protein yang bersifat bakterisidal. *Lactobacillus plantarum* berbentuk batang (0,5-1,5 s/d 1,0-10 μm) dan tidak bergerak (non motil) (Maryana, 2014).

Bakteri ini memiliki sifat katalase negatif, aerob atau *fakultatif anaerob*, mampu mencairkan gelatin, cepat mencerna protein, tidak mereduksi nitrat, toleran terhadap asam, dan mampu memproduksi asam laktat. Dalam media agar, *Lactobacillus plantarum* membentuk koloni berukuran 2-3 mm, berwarna putih opa, konveks dan dikenal sebagai bakteri pembentuk asam laktat (Kuswanto dan Sudarmadji, 1988). *Lactobacillus plantarum* mampu merombak senyawa 12 kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana dengan hasil akhirnya yaitu asam laktat. Menurut Buckle *et al* (1978) asam laktat dapat menghasilkan pH yang rendah pada substrat sehingga menimbulkan suasana asam. *Lactobacillus plantarum* dapat meningkatkan keasaman sebesar 1,5 sampai 2,0% pada substrat (Maryana, 2014).

Pertumbuhan *L. plantarum* dapat menghambat kontaminasi dari mikroorganisme patogen dan penghasil racun karena kemampuannya untuk menghasilkan asam laktat dan menurunkan pH substrat, selain itu BAL dapat menghasilkan hidrogen peroksida yang dapat berfungsi sebagai antibakteri (Suriawiria, 1983). *Lactobacillus plantarum* juga mempunyai kemampuan untuk menghasilkan bakteriosin yang berfungsi sebagai zat antibiotik (Jenie dan Rini, 1995).

Lactobacillus plantarum dapat ditemukan pada proses pematangan keju dan dapat diisolasi dari produk-produk susu, koloninya berwarna putih atau kuning dan beberapa galur bersifat motil. Suatu senyawa antimikroba diproduksi oleh bakteri

asam laktat yang diidentifikasi sebagai *L. plantarum*. Senyawa antimikroba tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *E. coli*, *S. typhimurium* dan *S. aureus*. Senyawa antimikrob yang diproduksi oleh *L. plantarum* ini mengandung bakteriosin yang disebut sebagai *plantaricin* (Maryana, 2014).

C. Teori yang Relevan dengan Variabel

1. Susu Sapi

Susu merupakan bahan makanan yang istimewa bagi manusia karena lezat dan komposisinya yaitu mengandung semua zat gizi yang dibutuhkan oleh tubuh. Susu yang dihasilkan oleh sapi perah merupakan salah satu sumber protein dalam memenuhi kebutuhan hidup. Selain manajemen dan tatalaksana pemeliharaan, agar produksi susu dapat meningkat yang perlu mendapat perhatian adalah periode laktasi pada sapi perah. Produksi susu sapi perah perlaktasi akan meningkat terus sampai dengan periode laktasi yang ke-4 atau pada umur 6 tahun, apabila sapi perah itu pada umur 2 tahun sudah melahirkan (laktasi pertama) dan setelah itu terjadi penurunan produksi susu. Selama laktasi, kesehatan dan kebersihan sapi perah harus selalu dijaga dengan baik (Sangbara, 2011: 2).

Air susu dari hasil pemerahan ternak sapi perah dapat digunakan masyarakat sebagai mata pencaharian. Air susu dapat diolah menjadi es krim, yoghurt, susu bubuk, dangke, dan lain lain. Masyarakat khususnya di Kabupaten Enrekang mengolah hasil produksi susu ternak mereka menjadi dangke. Susu dapat diolah menjadi berbagai produk seperti mentega, yoghurt, es krim, keju, susu kental manis, susu bubuk, dangke dan lain-lain untuk konsumsi manusia. Susu merupakan

minuman yang hampir sempurna, karena kandungan nutrisinya lengkap dan cukup untuk memenuhi kebutuhan hidup pokok manusia. Sebagaimana produk peternakan, susu sangat mudah mengalami kerusakan akibat pertumbuhan mikroorganisme patogen (Afriani S & Haris L, 2011: 36).

Laktoferin (LF) disebut sebagai protein anti mikrobial, merupakan salah satu protein yang secara alami ditemukan dalam susu. Laktoferin adalah glikoprotein berbentuk bulat dengan massa molekul sekitar 80 kDa yang banyak ditemui dalam cairan sekresi seperti susu. Laktoferin mampu mengikat ion besi (FE) dari mikroba, sehingga dapat menghambat pertumbuhan dan mematikan mikroba. Laktoferin ditemukan dalam jumlah besar dalam sekresi mamalia seperti susu, air mata dan saliva (Ferdina M. Dkk, 2013: 155).

Air susu merupakan bahan makanan yang istimewa bagi manusia karena kelezatan dan komposisinya yang ideal selain air susu mengandung semua zat yang dibutuhkan oleh tubuh, tetapi tidak semua orang meminum susu alasannya ada yang tidak menyukai aroma (susu segar) dan rasa air susu, dan adapula yang menganggap harga susu mahal. Tetapi dengan adanya teknologi pengolahan/pengawetan maka masalah untuk aroma dan rasa air susu dapat diatasi sehingga air susu beraroma enak dan disukai orang. Salah satunya yaitu dengan membuat dangke dari air susu (Wahyuni R, 2013: 14).

Susu segar merupakan bahan pangan yang sangat tinggi gizinya, sehingga bukan saja bermanfaat bagi manusia tetapi juga bagi jasad renik pembusuk. Kontaminasi bakteri mampu berkembang dengan sangat cepat sehingga susu menjadi rusak dan tidak layak untuk konsumsi. Proses fermentasi akan mengubah laktosa

dalam susu menjadi glukosa dan galaktosa oleh aktivitas kultur starter sehingga akan mengurangi gangguan pencernaan bila mengkonsumsinya. Produk susu fermentasi tersebut, dibedakan berdasarkan jenis bakteri asam laktatnya. Bakteri asam laktat akan menghidrolisis laktosa yang di dalam susu, menjadi berbagai macam senyawa karbohidrat lebih sederhana (Afriani, 2010: 280).

Salah satu protein hewani yang banyak dikonsumsi masyarakat adalah susu. Susu adalah hasil perahan dari sekresi kelenjar ambing ternak yang menyusui. Air susu sapi mengandung semua bahan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan anak sapi dan sebagai bahan minuman manusia yang sempurna, sebab susu sapi merupakan sumber protein, lemak, karbohidrat, mineral dan vitamin. Zat-zat gizi yang terkandung di dalamnya dalam perbandingan yang sempurna, mudah dicerna, dan tidak ada sisa yang terbuang (AAK 1995, 105 dalam Dewi, 2009: 3).

Kelebihan susu sebagai bahan pangan bernilai gizi tinggi adalah dengan cara mengolah susu tersebut menjadi produk olahan untuk memperpanjang masa simpan. survey yang dilakukan oleh Dinas Peternakan Provinsi Jawa Barat pada tahun 2007 adalah bahwa sekitar 52% masyarakat memilih keju sebagai produk olahan susu yang paling disukai dibandingkan yoghurt dan es krim. susu merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikroba, selain itu susu dapat mudah rusak jika tidak ditangani dengan baik, sehingga masa simpan susu relatif singkat (Astri M, 2013: 244-245).

Susu merupakan salah satu bahan pangan yang kaya akan zat gizi. Kandungan protein, glukosa, lipida, garam mineral, dan vitamin dengan pH sekitar 6,80 menyebabkan mikroorganisme mudah tumbuh dan berkembang biak dalam susu. Secara alami, susu mengandung mikroorganisme kurang dari 5×10^3 per ml jika

diperah dengan cara yang benar dan berasal dari sapi yang sehat. produk susu selain sebagai upaya dalam meningkatkan konsumsi gizi masyarakat dengan daya tarik keragaman produk, diversifikasi juga bertujuan untuk meningkatkan daya tahan produk sehingga dapat mengatasi masalah pengangkutan dan penyimpanan produk (Fitria Isnaya, 2012: 1 dan 11).

Standar mutu air susu sapi segar merupakan rincian persyaratan yang mencakup kriteria 1) Inderawi, antara lain: bau, rasa, kenampakan warna; 2) Fisikawi, yaitu bentuk, ukuran, kotoran; 3) Kimiawi, antara lain: pH, kadar nutrisi atau senyawa kimia dan 4) Mikrobiawi antara lain: jumlah bakteri, kapang/jamur dan *yeast*. Persyaratan ini sebagai acuan untuk dapat menjaga keamanan dan konsistensi mutu air susu sapi segar. Kualitas mikrobiologis susu merupakan salah satu standar mutu yang perlu diperhatikan, kondisi mikrobiologis air susu dipengaruhi oleh kontaminasi yang menyebabkan air susu tidak layak konsumsi dan mengakibatkan gangguan kesehatan mulai dari diare, mual-mual, pusing, demam tinggi sampai pada keracunan pangan (Santoso & Rukmi, 2012: 2).

2. Bakteri Pada Susu

Secara fisiologis, susu merupakan sekresi kelenjar ambing sebagai makanan dan proteksi imunologis (*immunological protection*) bagi bayi mamalia. Dalam SK Dirjen Peternakan No. 17 tahun 1983 dijelaskan, susu adalah susu sapi yang meliputi susu segar, susu murni, susu pasteurisasi, dan susu sterilisasi. Susu segar adalah susu murni yang tidak mengalami proses pemanasan. Susu murni adalah cairan yang berasal dari ambing sapi sehat yang diperoleh dengan cara pemerahan yang benar tanpa mengurangi atau menambah sesuatu komponen atau bahan lain. Susu

merupakan salah satu bahan pangan yang kaya akan zat gizi. Kandungan protein, glukosa, lipida, garam mineral, dan vitamin dengan pH sekitar 6,80 menyebabkan mikroorganisme mudah tumbuh dalam susu. secara alami, susu mengandung mikroorganisme kurang dari 5×10^3 per mil, jika pemerahan susu benar dan baik dilakukan maka prevalensi kontaminasi bakteri *Escherichia coli* negatif, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* (Suwito W, 2010: 96).

Terjadinya kontaminasi bakteri dapat dimulai ketika susu diperah dari puting sapi. Lubang puting susu memiliki diameter kecil yang memungkinkan bakteri tumbuh di sekitarnya. Bakteri ini ikut terbawa dengan susu ketika diperah. Meskipun demikian, aplikasi teknologi dapat mengurangi tingkat pencemaran pada tahap ini dengan penggunaan mesin pemerah susu (milking machine), sehingga susu yang keluar dari puting tidak mengalami kontak dengan udara. Keamanan susu terhadap kontaminasi kuman selama proses distribusi menjadi sangat penting karena proses pasteurisasi tidak membunuh semua bakteri yang ada dalam susu. Mulai dari saat pemerahan hingga tahap pasteurisasi kuman di dalam susu telah berkurang cukup banyak, akan tetapi pada tahap pendistribusian susu dapat menjadi sumber masuknya kontaminan pada susu walaupun susu tersebut telah dipasteurisasi. Kontaminan yang sering ada dalam susu yang kurang diawasi tahap pendistribusiannya antara lain flora psikotrofik seperti *Listeria sp* dan *Pseudomonas sp*, *enterobacter*, jamur, serta kapang. Peralatan pemerahan yang tidak steril dan tempat penyimpanan yang tidak bersih dapat menyebabkan tercemarnya susu oleh bakteri. Susu memerlukan penyimpanan dalam temperatur rendah agar tidak terjadi kontaminasi bakteri. Udara yang terdapat dalam lingkungan di sekitar tempat pengolahan merupakan media yang

dapat membawa bakteri untuk mencemari susu. Proses pengolahan susu sangat dianjurkan untuk dilakukan di dalam ruangan tertutup (M.H.P Hendra, 2009: 3-4).

Kontaminasi air susu dapat berakibat pada kejadian keracunan yang membuktikan bahwa pentingnya pengawasan terhadap keamanan air susu yang dikonsumsi masyarakat dan berdampak pada kesehatan masyarakat. Untuk mencegah adanya kontaminasi pada air susu, maka diperlukan standar prosedur pemerahan dan penanganan air susu pasca panen. Prosedur meliputi persiapan sapi yang akan diperah, kondisi kandang, kondisi pemerah, peralatan dan proses penyimpanan. Kontaminasi air susu bersumber dari tubuh sapi yang kotor, tangan pemerah yang kurang bersih, keadaan kandang yang kurang bersih serta debu atau faktor lain yang dapat menyebabkan terjadinya kontaminasi terhadap air susu. Perhitungan pemeliharaan susu sapi serta kesehatan dari sapi tersebut dapat menjadi faktor penentu baiknya kualitas susu sapi (Santoso & Rukmi, 2012: 2-3).

Jenis bakteri yang terdapat pada susu yaitu *S. Aureus*, *Salmonella*, *E. Coli*. Pencemaran dalam susu dapat diklasifikasikan menjadi dua, yaitu bakteri patogen dan bakteri pembusuk. Bakteri pembusuk seperti *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp., dan *Bacillus* sp. Akan menguraikan protein menjadi asam amino dan merombak lemak dengan enzim lipase sehingga susu menjadi asam dan berlendir. Beberapa *Bacillus* sp. yang mencemari susu antara lain adalah *B. cereus*, *B. subtilis*, dan *B.licheniformis*. Bakteri patogen yang sering mencemari susu salah satunya adalah *E. coli*. Pada manusia, *E. coli* yang menyebabkan diare dikelompokkan menjadi empat, yaitu enterotoksigenik *E. coli* (ETEC), enteroinvasif *E. Coli* (EIEC), enteropatogenik *E.coli* (EPEC), dan enterohemoragik *E. Coli* (EHEC). Virulens ETEC disebabkan adanya

ekspresi antigen fimbria sehingga memungkinkan *E. coli* menempel pada sel usus mamalia dan memproduksi enterotoksin yang bersifat tahan panas (*heat stable*) dan tidak tahan panas (*heat labile*). Enterotoksin akan memengaruhi sekresi cairan saluran pencernaan melalui peningkatan konsentrasi *cyclic* AMP (cAMP) ataupun cGMP. Pada saluran pencernaan manusia, EPEC akan menyebabkan atrofi dan nekrosis usus. Pada anak-anak, EPEC menyebabkan diare, sedangkan EHEC akan membentuk koloni pada saluran pencernaan sehingga mengakibatkan terjadinya atrofi dari mikrofili sel-sel epitel usus. Kontaminasi pada susu dapat dikurangi antara lain dengan menjaga kesehatan ternak, higiene susu, dan pasteurisasi. Higiene personal berperan penting pula dalam mencegah keracunan setelah minum susu. Penerimaan bahan baku harus memenuhi standar SNI susu segar. Selama penanganan, susu ditempatkan pada suhu dingin dalam *milk can* tertutup sehingga terhindar dari kontaminasi lingkungan. Untuk susu segar yang telah memenuhi standar SNI, proses penyimpanan dan pendistribusiannya sampai ke tangan konsumen perlu diperhatikan. Penyimpanan harus ditempatkan pada suhu dingin sampai susu ke tangan konsumen karena meskipun telah melalui proses pasteurisasi, susu masih mengandung bakteri pembusuk. Bakteri pembusuk akan berkembang pada suhu ruang. Oleh karena itu, susu pasteurisasi harus disimpan pada kondisi dingin (Suwito W, 2010: 97-98).

Susu normal yang langsung berasal dari sapi seharusnya bebas dari bakteri-bakteri, bakteri tersebut antara lain bakteri coliform, bakteri psikotrofik dan bakteri thermodurik. Keberadaan *Escherichia coli* biasanya menunjukkan adanya kontaminasi dari bahan fekal yang ada dalam tanah, air, jerami, butir padi dan makanan lain yang dikonsumsi oleh sapi dengan proses produksi yang baik serta

pemerahan yang sangat dilihat kebersihannya. Susu sapi segar biasanya mengandung kurang dari 100 bakteri koliform permililiter, tetapi jika produksi susu serta kebersihan pada saat pemerahan tidak di perhatikan maka susu segar dapat mengandung 2000 bakteri koliform permililiter. Resiko masuknya kuman kedalam susu dapat berasal dari pekerja pemerah susu, peralatan pemerah susu, dari udara, dari kandang sapi, proses pemerahan yang kurang bersih, proses pendistribusian yang kurang bersih dan dari puting sapi yang terinfeksi. Bakteri psikotrofik adalah bakteri yang dapat tumbuh pada suhu 7°C atau kurang, bakteri tersebut dapat menyebabkan busuknya susu atau produk harian yang disimpan di dalam kulkas. Bakteri psikotrofik yang paling sering ditemukan dalam susu adalah bakteri batang gram negatif, kebanyakan dari genus *Pseudomonas*. Bakteri batang gram negatif ini umumnya tidak selamat dari proses pasteurisasi dan muncul dalam susu sebagai kontaminan post pasteurisasi. Bakteri psikotrofik bisa terdapat dalam jumlah kecil pada air untuk mencuci peralatan sehari-hari yang tidak dikontrol kualitasnya. Bakteri termodurik adalah bakteri yang dapat bertahan terhadap proses pasteurisasi. Sumber utama penyebaran bakteri termodurik adalah peralatan yang jarang dibersihkan, alat pemerahan berbahan karet yang sudah lama dan tidak pernah di sterilisasi serta tempat penyimpanan susu yang tidak bersih. Bakteri termodurik ini mengkontaminasi susu di peternakan ataupun di pabrik pengolahan susu (M.H.P Hendra, 2009: 12-14).

3. Whey Dangke

Whey dangke adalah sisa hasil pengolahan dangke yang jumlahnya sekitar 3.600 liter perhari dan umumnya dibuang begitusaja. Penanganan *whey* dangke sangat diperlukan untuk pencegahan pencemaran lingkungan khususnya di

Kabupaten Enrekang. Evaluasi karakteristik *whey* dangke merupakan langkah awal penanganan *whey* dangke. *Whey* dangke dapat diolah menjadi berbagai produk yang salah satunya menjadi produk minuman fermentasi. Komponen nutrisi *whey* dangke dapat dimanfaatkan oleh bakteri sebagai sumber nutrisi pertumbuhan. Komponen bioaktif *whey* menyebabkan produk fermentasi memiliki aktivitas antibakteri patogen, sehingga dapat lebih meningkat dengan penggunaan probiotik (Fatma Dkk, 2012: 353)

Whey merupakan hasil samping dari pengolahan keju yang dihasilkan dari satu tahapan dalam proses pembuatan keju. Selama ini *whey* pada kebanyakan perusahaan keju hanya menjadi limbah karena nilai ekonomisnya sangat rendah. Apabila dilihat dari nilai gizinya, *whey* masih bisa dimanfaatkan atau diolah menjadi produk yang lebih bernilai. *Whey* tersusun atas laktosa, persenyawaan nitrogen (protein, peptida dan asam amino), abu dan lemak. Protein *whey* adalah protein yang alami dan berkualitas tinggi berasal dari susu. Protein ini terdiri atas asam-asam amino yang dibutuhkan oleh tubuh untuk sintesis protein otot. Umumnya *whey* digunakan sebagai bahan tambahan dalam pembuatan beberapa produk pangan dengan memanfaatkan sifat fungsional yang dimilikinya, diantaranya adalah dalam pembuatan produk permen, minuman siap saji, *smoothy*, pengganti tepung, sereal, es krim, roti dan produk pangan yang lainnya (Anita R, 2010: 1)

Pengolahan air limbah industri pangan umumnya dilakukan dengan menggunakan sistem lumpur aktif, karena sistem ini telah terbukti efektif untuk mengolah air limbah dengan kandungan utama bahan organik. Salah satu limbah industri rumah yaitu limbah dangke atau yang biasa disebut *Whey* dangke. Sebagai

suatu olahan susu, produk dangke memiliki nilai tambah dari *whey* sebagai suatu produk sampingan. Ada potensi mengkonversi *whey* menjadi produk baru yang bernilai gizi tinggi misalnya dibuat *nata de whey*. Namun saat ini para pengolah dangke di Desa Cendana Kecamatan Cendana belum melihat peluang ini, hanya menggunakan *whey* sebagai substitusi susu untuk anak sapi (Lintang S.F. Dkk, 2012: 111).

Whey dangke merupakan limbah dangke, yang belum banyak dimanfaatkan. Dangke merupakan produk sejenis keju tanpa fermentasi. *Whey* dangke dipisahkan dari curd menggunakan getah buah pepaya sebagai sumber enzim. *Whey* memiliki kandungan laktosa dan komponen nutrisi lainnya yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroorganisme. Viskositas minuman fermentasi dari *whey* akan mempunyai viskositas yang sangat rendah dibanding susu fermentasi lainnya. Hal ini karena total padatan *whey* hanya sekitar 6% (Gallardo-Escamila dkk., 2007). Penambahan tapioka ke dalam *whey* selama proses produksi dapat memperbaiki keadaan tersebut. Tapioka dapat berperan sebagai pengental (*thickener*) dalam pembuatan minuman fermentasi dan agen pembentuk gel (Fatma, 2012: 216).

D. Ayat dan Hadist yang Relevan

Menurut Islam semua makanan dan minuman yang halal, bersih, mengobati penyakit dan tidak mengandung bahaya sehingga layak untuk dikonsumsi. Semuanya seperti yang telah ada dalam ayat Al-Qur'an surah An-Nahl, 16: 66, sebagai berikut:

وَإِنَّ لَكُمْ فِي الْأَنْعَامِ لَعِبْرَةً ۚ تُسْقِيكُمْ مِمَّا فِي بُطُونِهِ مِنْ بَيْنِ فَرْثٍ وَدَمٍ لَبَنًا
خَالِصًا سَائِغًا لِلشَّارِبِينَ ٦٦

TERJEMAHNYA: “66. dan Sesungguhnya pada binatang ternak itu benar-benar terdapat pelajaran bagi kamu. Kami memberimu minum dari pada apa yang berada dalam perutnya (berupa) susu yang bersih antara tahi dan darah, yang mudah ditelan bagi orang-orang yang meminumnya”.

Ayat yang lalu menguraikan kuasa dan anugerah-Nya yang berkaitan dengan air yang dengannya terjadi kehidupan. Kini disebut anugerah serta bukti kuasa-Nya yang lain dengan menyatakan bahwa: *Dan di samping anugerah yang lalu, Kami juga menganugerahkan binatang-binatang untuk kamu, antara lain ternak. Sesungguhnya pada binatang-binatang ternak, unta atau juga sapi dan kambing, benar-benar terdapat 'Ibrah yakni pelajaran bagi kamu. Melalui pengamatan dan pemanfaatan binatang-binatang itu, kamu dapat memperoleh bukti kekuasaan Allah dan karunia-Nya, kami memberi kamu minum dari sebagian, yakni susu murni yang penuh gizi yang ada dalam perutnya, dan juga selain susunya, padanya, yakni pada binatang-binatang ternak itu secara khusus terdapat juga faedah yang banyak untuk kamu seperti daging, kulit dan bulunya. Semua itu dapat kamu manfaatkan untuk berbagai tujuan, dan sebagian darinya atas berkat Allah kamu makan dengan mudah lagi lezat dan bergizi. Dan di atasnya, yakni di atas punggung binatang-binatang itu yakni unta dan juga diatas perahu-perahu kamu dan barang-barang kamu diangkat atas izin Allah menuju tempat-tempat yang jauh (Shihab 2002, 177).*

Kata (عِبْرَةٌ) 'Ibrah terambil dari kata (عَبَرَ) 'abara yang berarti melewati/menyeberang. Kata 'Ibrah digunakan dalam arti dalil atau cara untuk mencapai sesuatu dari sesuatu yang lain. Seakan-akan pelakunya *melewati* dan

menyeberangi suatu tempat/ hal untuk mencapai hal/ tempat yang lain. Memperhatikan keadaan binatang ternak dan mengetahui keadaan dan keistimewaannya dapat mengantar seseorang menuju pengetahuan baru (Shihab 2002, 177).

‘Ibrah/ pelajaran yang dapat ditarik dari binatang sungguh banyak, termasuk sifat dagingnya yang berbeda satu dengan yang lain. Ada yang lezat dan bergizi, ada juga yang berbahaya untuk dimakan. Perangai, keistimewaan dan kemampuannya pun berbeda-beda. Kemampuan manusia menjinakkannya pun merupakan *‘Ibrah* dan kesediaan binatang-binatang tertentu untuk ditunggangi walau ia lebih kuat dan besar dari pada manusia juga dapat menjadi pelajaran. *‘Ibrah* serta bukti tentang besarnya anugerah Allah kepada manusia (Shihab 2002, 178).

Pada ayat diatas menjelaskan kekuasaan Allah SWT dari hewan ternak seperti sapi, kerbau, unta dan kambing dapat menghasilkan suatu minuman yang sangat bermanfaat bagi tubuh manusia yaitu susu. Susu dihasilkan dan diperas dari sapi yang berkualitas baik dimana susu merupakan minuman empat sehat lima sempurna, kuasanya Allah menciptakan apa yang ada dilangit dan dibumi yang dapat dimanfaatkan orang banyak sebagai kebutuhan hidup. Salah satu pelajaran penting yang bisa diambil dari binatang yakni susu yang sangat bergizi dimana darinya dapat tumbuh mikroorganisme berupa bakteri yang dapat dimanfaatkan manusia sebagai minuman probiotik didalam susu.

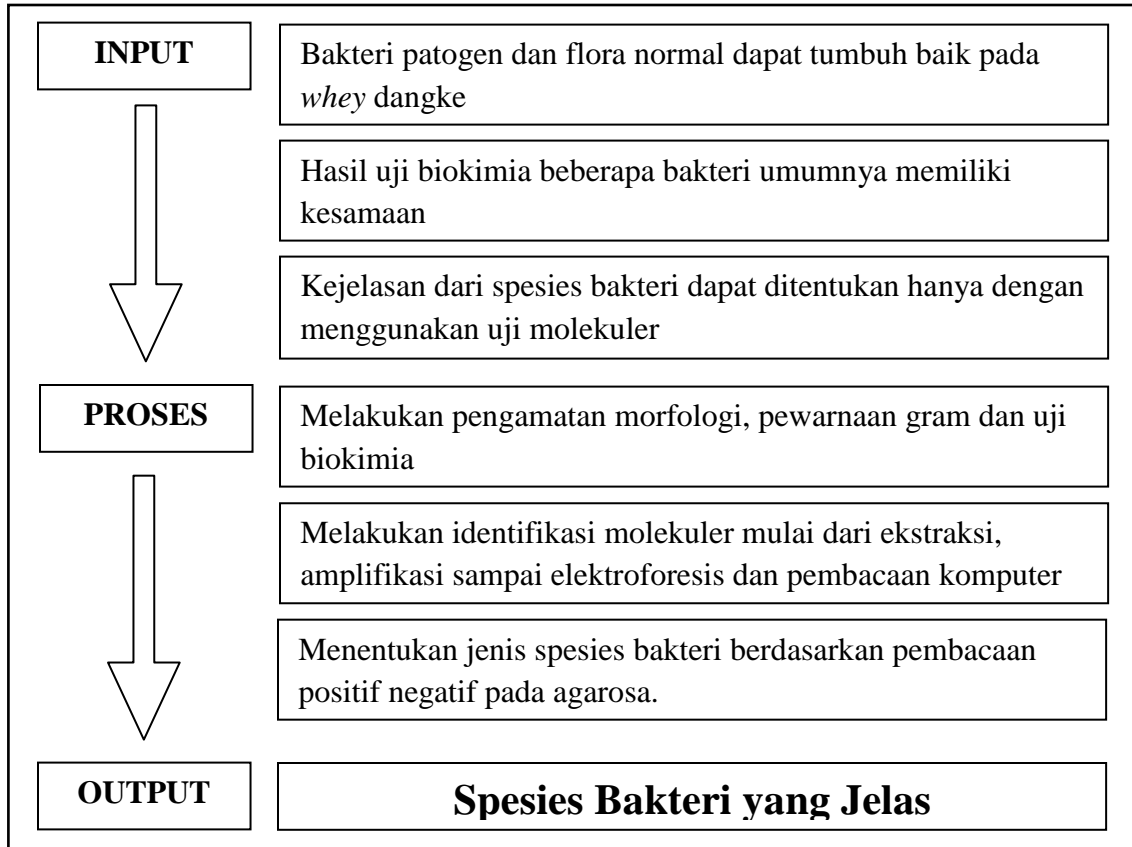
Ali 'Imran ayat 191 yang berbunyi :

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمٰوٰتِ
وَالْاَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هٰذَا بَطِلًا سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ١٩١

TERJEMAHNYA: “191. (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan Kami, Tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha suci Engkau, Maka peliharalah Kami dari siksa neraka”.

Didalam surat ali imran: 191 diatas menjelaskan bahwa Allah tidak menciptakan sesuatu dengan sia-sia melainkan ada manfaat didalamnya. Begitupun dengan *whey* dangke yang merupakan hasil samping dalam pembuatan dangke. Meskipun merupakan limbah dari pembuatan dangke, *whey* tersebut masih memiliki banyak nutrisi yang terkandung didalamnya. *Whey* dapat dimanfaatkan bakteri untuk berkembang khususnya bakteri asam laktat yang berpotensi sebagai bakteri baik dalam tubuh manusia. Dengan menerapkan ‘ibrah dari bakteri pada *whey* ini, maka dapat dimanfaatkan untuk kehidupan makhluk hidup khususnya manusia misalnya dimanfaatkan sebagai minuman probiotik.

Sungguh maha kuasa Allah terhadap segala sesuatu yang ada dimuka bumi ini. Segala sesuatu yang Allah ciptakan masing-masing memiliki peranan tersendiri. Tiada sesuatupun yang sia-sia, bahkan hal terkecil sekalipun. Sesuatu yang menurut kebanyakan orang tidak memiliki manfaat ternyata memiliki kegunaan sendiri. Misalnya saja bakteri yang dianggap orang hanya memiliki dampak negatif, namun pada prespektif sains memiliki banyak manfaat misalnya saja sebagai flora normal.

E. Kerangka Fikir

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif kualitatif experimental dengan model eksploratif untuk menentukan spesies bakteri asam laktat limbah pembuatan dangke susu sapi. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Universitas Hasanuddin.

B. Populasi Sampel

Pada penelitian yang dilakukan, bakteri merupakan populasi. Sedangkan sampelnya adalah bakteri asam laktat yang terdapat pada *whey* dangke.

C. Variabel Penelitian

Penelitian ini memiliki variable tunggal yaitu jenis bakteri di limbah pembuatan dangke yang diidentifikasi dengan menggunakan uji morfologi, pengujian sifat biokimia dan uji molekuler.

D. Definisi Operasional Variabel

1. Identifikasi molekuler merupakan pengujian yang dilakukan untuk mengetahui secara pasti spesies bakteri yang terdapat pada limbah dangke yang berbahan dasar susu sapi dengan menggunakan PCR.

2. Bakteri asam laktat adalah kelompok bakteri yang mampu mengubah karbohidrat (glukosa) menjadi asam laktat yang diisolasi dari limbah dangke (*Whey*) dengan bahan dasar susu sapi menggunakan medium MRSA dengan metode tuang yang diinkubasi pada suhu 35°C selama 48 jam.

E. Instrumen Penelitian

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain autoklaf, botol, tempurung kelapa, sendok, cawan petri, inkubator, labu Erlenmeyer, gelas piala, lamina air flow, gelas ukur, pipet tetes, jarum ose, bunsen, gelas objek, deck glass, korek api, mikropipet, tip, water bath, vortex, pH indikator, mikroskop, neraca analitik, spatula, gelas objek, tabung reaksi, kertas label, spoit, water bath, pinset, rak, gelas kimia, penghalus, saringan,, heating blok, stopwatch, PCR workstation/cabinet (Scie-Plus)/Biosafety cabinet, Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem), satu set alat elektroforesis, UV transulaminator, komputer, oven, Freezer -20⁰C, Sub Cell GT Electrofofesis System, Profuge Gk-Centrifuge, ice maker (Memmert), Gel Doc XR Model 785.

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain air suling, limbah dangke, medium pertumbuhan (MRS broth), CaCO₃ 1%, larutan pewarnaan Gram (alkohol 96%, kristal violet, Iodium, Safranin), medium pengujian aktivitas biokimia (uji KIA, uji motility, reagen Ehrlich, reagen kovac, uji Metil Red, uji Voges Proskauer, alfa-naftol, KOH, uji sitrat, uji urea), medium uji karbohidrat

(glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol, D-xylose, rhamnosa, trehalose, L-arabinosa, dextrosa, dulcitol, DL-phenylalanine, sorbitol, inositol, raffinosa dan malonat), uji katalase, H₂O₂, tube, etanol 96%, protease, buffer AL-mix, korek, tissu, medic cool, kit, primer forward, primer reverse, Tabung PCR (Sorensen, Cat. No 35900). Parafilm (Sigma, Cat. No P 7543), Erlenmeyer (Schott), Filter tips 0.5 - 10µl (MBP, Cat. No 3501), Filter tips 10 - 200µl (MBP, Cat. No 3922), Filter tips 100 - 1000µl (MBP, Cat. No 3951), Disposable gloves, VipPlus PCR Chiller, Tabung eppendorf, Loading dye, Agarose, Marker 100bp, Kit ekstraksi DNA dan TBE Buffer 10x

F. Prosedur Kerja

1. Tahap Persiapan

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dicuci bersih lalu dibilas dengan air suling, kemudian alat-alat gelas disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Alat-alat logam disterilkan dengan cara dipijarkan menggunakan lampu spiritus.

b. Pembuatan Medium

Bahan-bahan yang akan digunakan disiapkan untuk pembuatan masing-masing medium seperti MRS (*Man, Rogosa and Sharpe*) broth dan agar untuk bakteri gram positif, *Nutrient Agar* (NA) dan Pepton Water untuk bakteri gram negatif, dan medium pengujian aktivitas biokimia. Bahan tersebut ditimbang sesuai dengan komposisi masing-masing medium yang akan dibuat, kemudian dilarutkan dengan air

suling steril, selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada tekanan atmosfer 2 atm dengan suhu 121°C selama 15 menit. Medium yang telah disterilkan diletakkan pada ruangan steril selama 2 hari.

c. Pembuatan Dangke dan Preparasi Sampel

1) Isolasi dan Seleksi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Dangke

Limbah Dangke diinokulasikan pada medium cair MRS Broth dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur dari MRS Broth diinokulasikan pada medium MRSA dengan penambahan BCP 1% selanjutnya diinkubasi selama 48 jam. Koloni yang di sekitarnya terbentuk zona bening dimurnikan kembali pada medium MRSA dengan metode goresan sinambung lalu diinkubasi selama 24 – 48 jam. Penanaman dilakukan berulang-ulang pada medium dan kondisi yang sama hingga didapatkan koloni tunggal. Isolat murni tersebut lalu dipindahkan pada agar miring sebagai stok dan disimpan di *refrigerator* pada suhu 4°C.

2. Karakterisasi Bakteri

1. Identifikasi Morfologi Secara Mikroskopik dengan Pewarnaan Gram

Gelas objek dibersihkan dengan alkohol 96% kemudian difiksasi di atas lampu spiritus, selanjutnya isolat aktif diambil secara aseptik dan diletakkan di atas gelas objek lalu diratakan. Difiksasi kembali di atas lampu spiritus. Setelah dingin ditetaskan cat Gram A (kristal violet) 2-3 tetes selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Setelah itu ditetesi dengan Gram B (Iodium) selama 1` menit, dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Kemudian ditetesi dengan Gram C (Alkohol 96 %) selama 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan di udara. Terakhir ditetesi dengan Gram D

(Safranin) selama 45 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan kelebihan air dihilangkan dengan kertas serap. Pengamatan ini dilakukan dengan melihat bentuk dan warna sel dibawah mikroskop dengan pembesaran tertentu.

2. Pengujian Aktivitas Biokimia

Aktivitas biokimia atau metabolisme adalah berbagai reaksi kimia yang berlangsung dalam tubuh makhluk hidup untuk mempertahankan hidup.

1. Uji Katalase

Isolat murni diletakkan di atas gelas objek kemudian di tetesi dengan H_2O_2 , lalu diamati ada tidaknya gelembung gas yang dihasilkan.

2. Uji Oksidase

Isolat murni sebanyak satu ose digoreskan keatas gelas objek kemudian ditetesi dengan reagen p-aminodimethylaniline sebanyak satu sampai dua tetes kemudian amati perubahan warna yang terjadi.

3. Uji MIO

Isolat murni diambil sebanyak satu ose ditusuk ke media MIO hingga hampir mencapai dasar tabung reaksi kemudian ditarik perlahan lalu digores pada bagian miringnya. Selanjutnya di inkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 1 x 24 jam.

4. Uji TSIA

Isolat murni diambil sebanyak satu ose ditusuk ke media TSIA hingga hampir mencapai dasar tabung reaksi kemudian ditarik perlahan lalu digores pada bagian miringnya. Selanjutnya di inkubasi pada suhu $37^{\circ}C$ selama 1 x 24 jam.

5. Uji LIA

Isolat murni diambil sebanyak satu ose ditusuk ke media LIA hingga hampir mencapai dasar tabung reaksi kemudian ditarik perlahan lalu digores pada bagian miringnya. Selanjutnya di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

6. Uji KIA

Isolat murni sebanyak satu ose digoreskan pada permukaan agar miring dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

7. Uji Degradasi Gelatin

Isolat murni diambil sebanyak satu ose secara aseptis kemudian dimasukkan kedalam media gelatin cair. Selanjutnya inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam. Setelah itu masukkan kedalam lemari es selama 2-3 menit.

8. Uji Urea

Isolat murni sebanyak satu ose digoreskan pada medium agar miring untuk uji urea dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

9. Uji Citrat

Isolat murni sebanyak satu ose digoreskan pada medium agar miring untuk uji citrat dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

10. Uji Metil Red

Isolat murni diambil sebanyak satu ose dimasukkan kedalam medium dan di homogenkan setelah itu di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam dan ditambahkan metil red.

11. Uji Voges Proskauer

Isolat murni diambil sebanyak satu ose dimasukkan kedalam medium dan di homogenkan. Di inkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam kemudian di tambahkan pereaksi alfa-naftol dan KOH.

12. Uji Karbohidrat

Pada uji karbohidrat ini terdiri dari beberapa medium glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol, D-xylose, rhamnosa, trehalose, L-arabinosa, dextrosa, dulcitol, DL-phenylalanine, sorbitol, inositol, raffinosa dan malonat. Pada setiap medium dimasukkan isolat murni sebanyak satu ose dan di homogenkan lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

3. *Identifikasi Molekuler*

1. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA pada dasarnya merupakan serangkaian proses pemisahan DNA dari komponen–komponen sel lainnya. Ekstraksi DNA pada organisme eukariot dilakukan melalui proses preparasi sampel (sample preparation), melisiskan sel (cell lysis), DNA binding, pencucian (wash) dan elution.

Langkah-langkah ekstraksi DNA adalah sebagai berikut:

- Sebanyak 200µl sample dimasukkan ke dalam tabung mikro sentrifuge 1,5 ml steril lalu ditambahkan 20µl Proteinase K,
- Homogenkan dengan cara pipetting, kemudian diinkubasi pada 60°C selama 5 menit.
- Tambahkan 200µl Buffer GSB (Geneaid) lalu vortex kemudian diinkubasi kembali pada temperature yang sama selama 2 menit.

Selanjutnya ditambahkan ethanol absolute (96%) dan vortex selama 10 detik.

- Pindahkan semua campuran tersebut ke dalam spin column, sentrifugasi pada 14.000 xg selama 1 menit. Buang collection tube yang berada di bawah spin column dan ganti dengan collection tube yang baru.
- Tambahkan 400µl buffer W1 lalu sentrifuge selama 30 detik dengan kecepatan yang sama kemudian buang cairan yang ada pada collection tube.
- Tambahkan 600µl *wash buffer* (Geneid) sentrifuge selama 30 detik, lalu buang cairan pada collection tube dan sentrifuge kembali selama 3 menit. Buang collection tube dan letakkan mikrocentrifuge steril pada bagian bawah spin column.
- Selanjutnya tambahkan 100 µl *Elution buffer* diamkan selama 3 menit kemudian sentrifuge dengan kecepatan yang sama selama 30 detik. Cairan yang mengandung DNA yang tertampung pada tabung mikrocentrifuge disimpan pada -4°C untuk digunakan sebagai template PCR.

2. Amplifikasi PCR (Polimerase Chain Reaction)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu proses sintesis enzimatis untuk melipat gandakan suatu sekuens nukleotida tertentu secara in vitro. Prosesnya meliputi 3 tahap, yaitu denaturasi dengan suhu 95°C selama 30 detik, annealing dengan suhu 55°C selama 30 detik dan ekstention dengan suhu 72°C selama 1 menit.

Prosedur ini dikerjakan pada sampel DNA yang telah diisolasi, ekstrak DNA dari sampel dan aquadest sebagai kontrol negatif. "PCR mix" dimasukkan ke dalam tabung PCR:

Tabel 3.1. Komposisi Primer Mix

Reaksi	(μ l)
ddH ₂ O	34.75
10X PCR buffer	5
25 mM MgCl ₂	2
5 mM Dntp	1
Reverse primer (20pmol)	1
Forward primer (20pmol)	1
Hotstart DNA pol.	0.25
DNA sample	5
Total premix	50

(Indah N, 2008)

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR (DNA thermal Cycler). Untuk amplifikasi PCR, tahap awal denaturasi pada suhu 95 °C selama 15 menit, selanjutnya 94 °C selama 1 menit, annealing pada suhu 55 °C selama 30 detik, ekstensi 72 °C selama 1 menit sebanyak 40 siklus dilanjutkan dengan ekstensi akhir suhu 72 °C selama 5 menit dan 12 °C \pm 30 menit untuk penyimpanan.

3. Elektroforesis gel agarosa

Agarosa dibuat dengan melarutkan 2 g agarose (BioRad) dalam 100 ml 10 Tris borate EDTA (100 g Tris base, 27.5 g asam borat, 20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0

dalam 1 liter air). Kemudian dipanaskan sampai mendidih dan larut. Selanjutnya ditambahkan 1 µl ethidium bromida (0.2 µg/ml) dan dimasukkan dalam pencetak gel yang telah dipasang sisir. Setelah agarosa memadat (sekitar 30 menit) selanjutnya dimasukkan ke dalam tank elektroforesis yang berisi larutan TBE 0.5%. Masukkan DNA sampel yang telah dicampur dengan cairan "loading dye" ke dalam sumur dengan perbandingan 2:1, kemudian dimasukkan Marker 100 bp setelah keseluruhan sampel dimasukkan. Elektroda dihubungkan dengan power supply kemudian dinyalakan selama 1 jam. Setelah itu, alat elektroforesis dimatikan kemudian gel dari alat tersebut diambil. Gel dipindahkan kedalam UV transiluminator kemudian diamati hasilnya pada komputer.

4. Analisis Data Sekuensing

Analisis data sekuensing dilakukan dengan menggunakan program *software* DNA star. Untuk analisa *sequence alignment*, dilakukan dengan membandingkan sekuens yang diperoleh (*query*) dengan yang telah ada pada *Gene Bank* dengan *database searches* NCBI *internet site* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Ukuran fragmen hasil amplifikasi PCR ditentukan dengan cara dibandingkan antara posisi ukuran penanda DNA (Marker) dengan ukuran fragmen sampel. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya band pada ukuran 996 bp.

Skema Kerja

1. Isolasi BAL



Limbah Dangke

- diinokulasikan pada medium cair MRS Broth
- diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
- diinokulasikan pada medium MRSA
- tambahkan BCP 1%, selanjutnya diinkubasi selama 48 jam.
- dimurnikan kembali pada medium MRSA dengan metode goresan sinambung
- diinkubasi selama 24 – 48 jam
- diulang hingga didapatkan koloni tunggal
- dipindahkan pada agar miring
- disimpan di *refrigerator* pada suhu 4°C.

**Isolat siap untuk
uji selanjutnya**

2. Pewarnaan Gram



- Memfiksasi isolat T
- Tambahkan Gram A (Kristal violet) 2-3 tetes
- Selama 1 menit
- Cuci dengan air mengalir lalu keringkan

- Tetesi isolat dengan Gram B (Iodium)
- Selama 1 menit
- Cuci dengan air mengalir lalu keringkan



- Tambahkan Gram C (alkohol 96%)
- Selama 30 detik
- Cuci air dengan air mengalir lalu keringkan

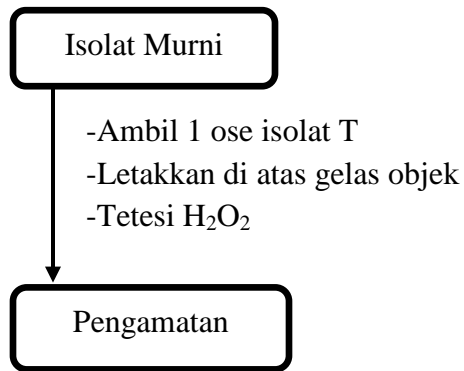
- Tambahkan Gram D (safranin)
- Selama 45 detik
- Cuci dengan air mengalir lalu keringkan



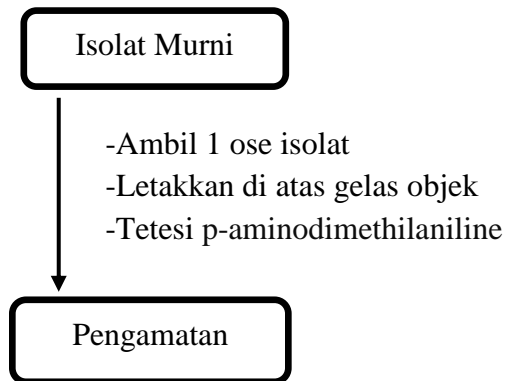
Hasil pencecatan
Gram dilihat dengan
Mikroskop

3. Pengujian Aktivitas Biokimia

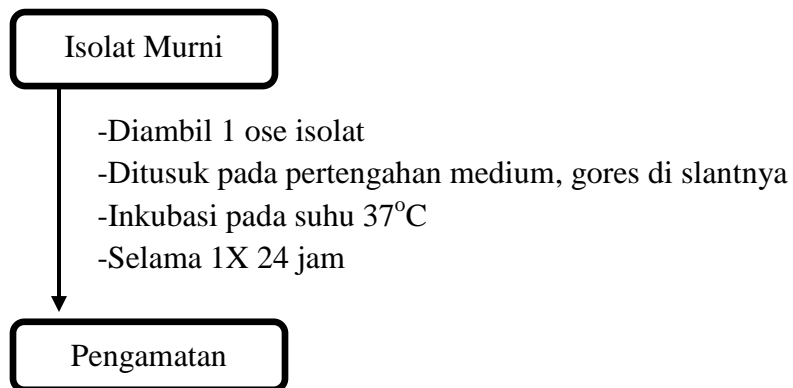
a) Uji Katalase



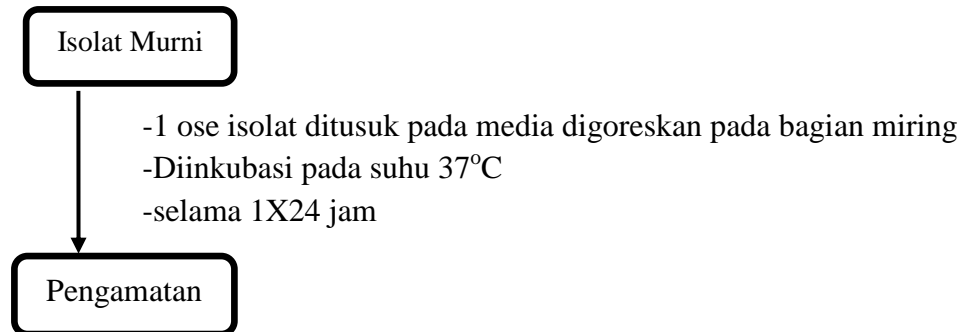
b) Uji Oksidase



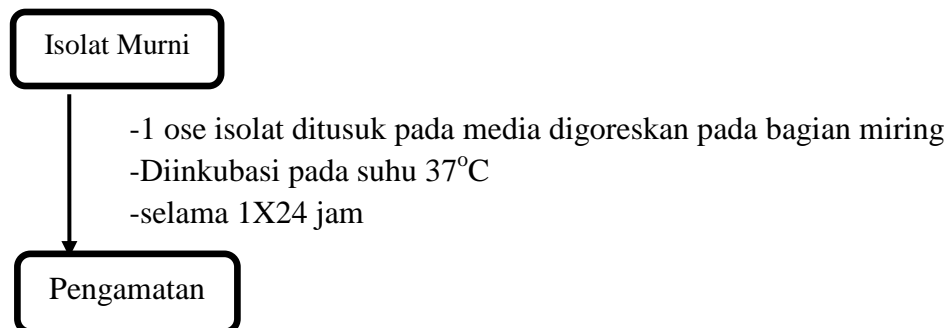
c) Uji MIO



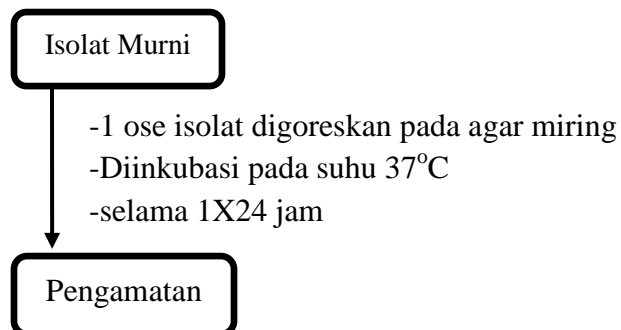
d) Uji TSIA



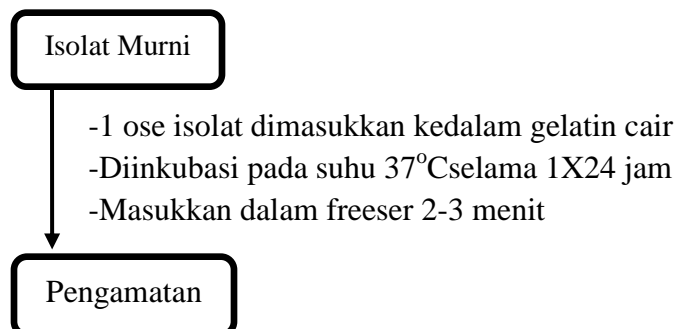
e) Uji LIA



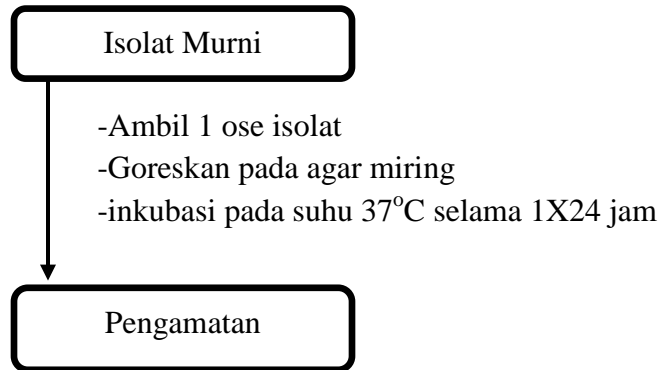
f) Uji KIA



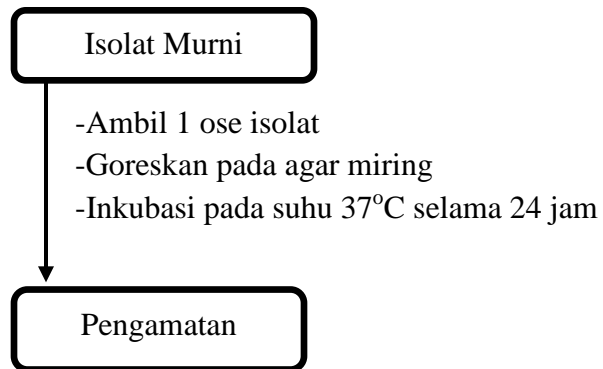
g) Uji Degradasi gelatin



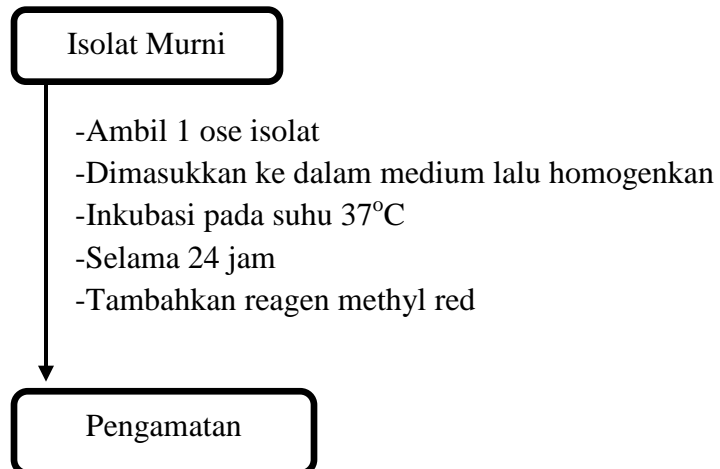
h) Uji Urea



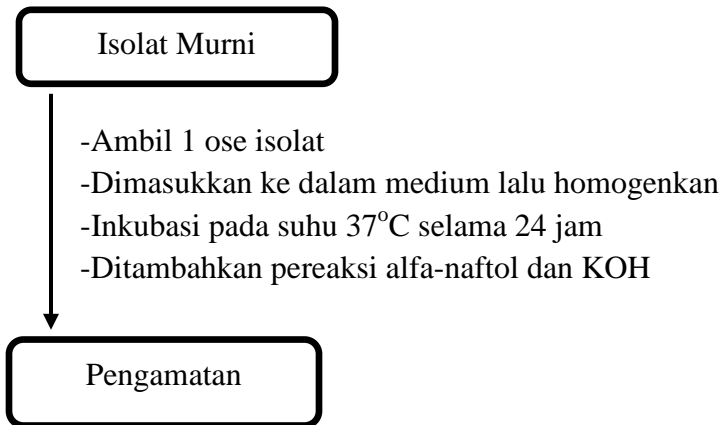
i) Uji Citrat



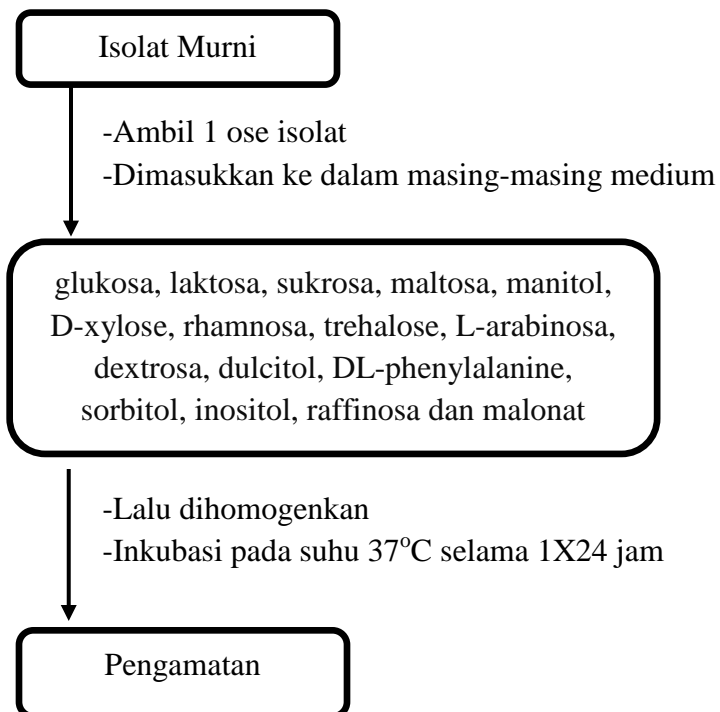
j) Uji Methyl Red



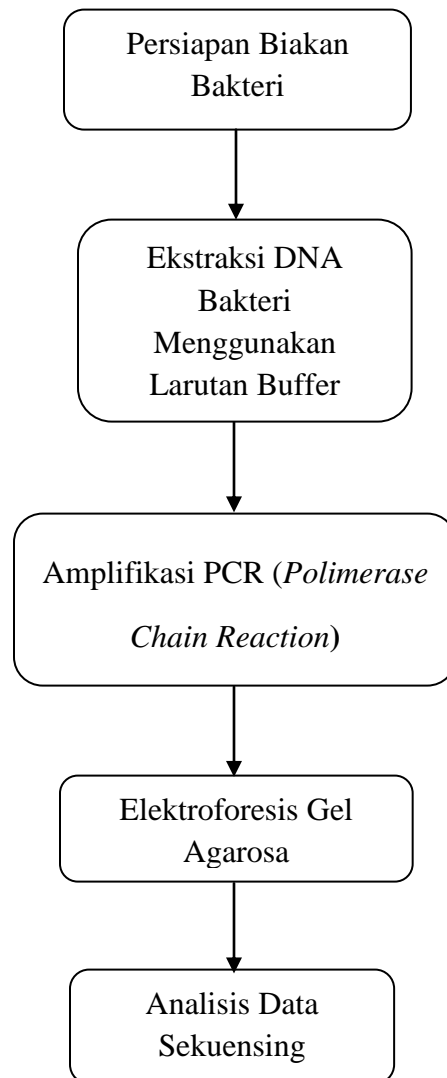
k) Uji Voges Proskauer



l) Uji karbohidrat



4. Identifikasi Molekuler



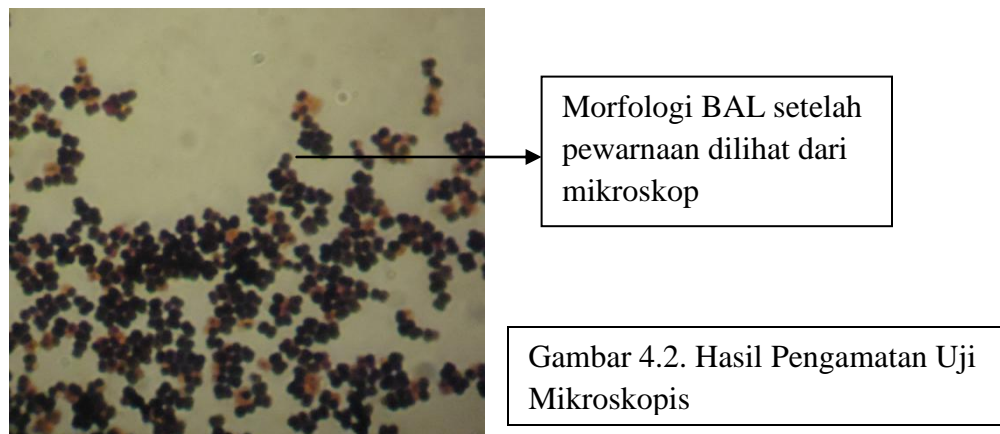
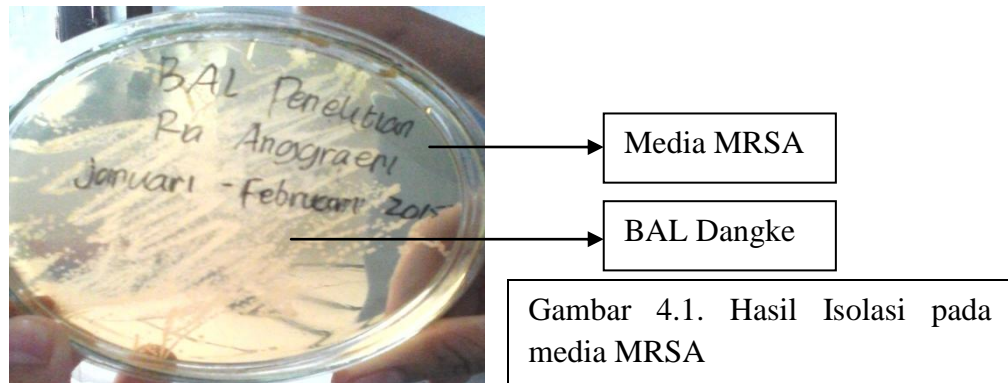
Gambar 3.1. Skema Kerja

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian

1. Isolasi dan Seleksi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Dangke



Sebanyak satu isolat bakteri telah diisolasi dari limbah dangke susu sapi dengan menggunakan media MRSA secara *pour plate* selama 1 x 24 jam masa inkubasi pada suhu 37°C. Isolat tersebut diberi simbol T. Untuk memastikan bahwa isolat tersebut merupakan bakteri asam laktat, isolat tersebut kemudian dimurnikan

dengan metode *quadrant streak* pada media MRSA kemudian diinkubasi kembali selama 2 x 24 jam pada suhu 37°C. Koloni murni yang telah diperoleh ditumbuhkan pada media MRSA miring dan dipakai sebagai stok isolat untuk uji selanjutnya.

2. Karakterisasi dan identifikasi Bakteri Asam Laktat

Isolat T mampu tumbuh pada media MRSA yang telah diberi BCP selanjutnya diamati bentuk selnya dan diuji secara biokimiawi untuk kepentingan karakterisasi dan identifikasi. Adapun uji biokimia yang dilakukan adalah uji KIA, motilitas, katalase, oksidase, MIO (Motil, Indol dan Ornithin), Of, TSIA, LIA, degradasi gelatin, urease, SCA, nitrate, malonate, arginine dihydrolisis, MRVP serta uji karbohidrat (glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, manitol, D-xylose, rhamnosa, trehalose, L-arabinosa, dextrosa, dulcitol, DL-phenylalanine, sorbitol, inositol, raffinosa dan malonat) sebagaimana terlihat pada Table 4.1:

(Table 4.1. Karakterisasi dan identifikasi Isolat T)

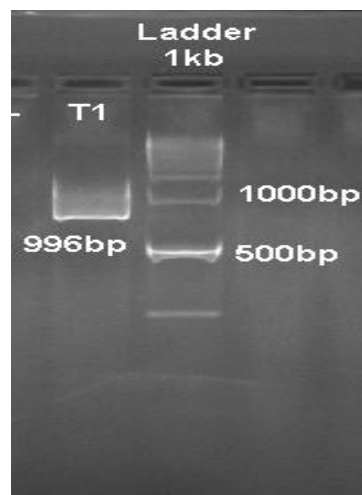
No.	Parameter Uji	Hasil
1	Morfologi	Tetracoccus
2	Gram	+
3	Katalase	-
4	Oksidase	-
5	MIO	-
	a. Motil	-
	b. Indol	-
	c. Ornithin	-

6	Of	+ (Fermentatif)
7	TSIA	A/A
	Produksi H ₂ S	-
8	LIA	
	a. Deaminase (Slant)	-
	b. Decarboxilase (Butt)	-
9	KIA	+
	a. Deaminase (Slant)	Kuning
	b. Decarboxilase (Butt)	Kuning
10	Degradasi gelatin	-
11	Urease	-
12	SCA	-
13	Nitrate	-
14	Malonate	-
15	Arginine Dihydrolisis	+
16	MRVP	
	a. MR	+
	b. VP	-
17	Produksi Asam	
	a. Glucosa/ Gas	+/+
	b. Sukrosa	+
	c. D-Xylose	-

	d. Lactose	+
	e. Maltosa	-
	f. Rhamnosa	-
	g. Trehalose	-
	h. D-mannitol	-
	i. L-arabinosa	-
	j. Dextrosa	+
	k. Dulcitol	-
	l. Tryptosa	-
	m. DL-Phenylalanine	-
	n. Sorbitol	-
	o. Inositol	-
	p. Raffinosa	-

3. Identifikasi Molekuler Bakteri Asam Laktat

Setelah melakukan identifikasi molekuler diperoleh hasil strain sebagai berikut:



(Gambar 4.3. Hasil Elektroforesis yang Nampak pada UV Transluminator).

```

NNNNNNNTTCGGATTTTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTAAGT
CTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAACTGGGAGACT
TGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA
TATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGTGTCTGGTCTGTAACGACGCTGAG
GCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
AACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGC
ATTAAGTAATCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAGAATTG
ACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAG
AACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCCTTC
GGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCTGAGATGTT
GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTCAAGTTG
GGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAA
CGAGTCGCGAAACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAACCATTCTCAGTTCCGGA
CTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
GCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATG
AGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCTA
AGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTACAGGGGTAGACCCAATAAAA.

```

(Gambar 4.4. Hasil Pembacaan urutan Basa Nitrogen).

B. Pembahasan

1. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Dangke

Isolat yang diperoleh dari limbah dangke susu sapi menunjukkan bahwa setelah dilakukan pemurnian berulang kali dengan menggunakan media MRSA. Isolat T yang berhasil dimurnikan selanjutnya, dilakukan uji pewarnaan gram dan pengamatan morfologis. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa bakteri T memiliki koloni kecil berbentuk *coccus* (bulat), elevasi cembung, tepi rata, permukaan berkilau, warna putih susu. Sifat ini diindikasikan sama dengan karakterisasi bakteri asam laktat dari genus *pediococcus* atau *tetragenococcus*.

2. Identifikasi Bakteri Asam Laktat

Hasil yang diperoleh pada pengujian di laboratorium menunjukkan bahwa Isolat T merupakan bakteri Gram positif yang artinya bakteri tersebut mengikat pewarna kristal violet dan menghasilkan warna biru keunguan. Hal ini disebabkan karena salah satu komponen penyusun bakteri yang disebut peptidoglikan.

Pewarnaan dilakukan dengan membuat bekasan isolat di gelas obyek, kemudian diwarnai dengan larutan Kristal violet dan yodium secara bergantian selama beberapa menit dan dicuci dengan aquades, selanjutnya dicuci dengan alkohol dan ditetesi dengan larutan cat penutup safranin. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop, bakteri Gram positif akan nampak berwarna ungu, sedangkan Gram negatif berwarna merah. Penyerapan warna yang dilakukan oleh bakteri gram positif akan lebih kuat karena susunan peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan bakteri gram negatif. Warna yang dihasilkan bakteri gram positif akan lebih gelap dari pada bakteri Gram negatif. Warna yang dihasilkan bakteri gram positif adalah biru keunguan sedangkan bakteri Gram negatif akan menghasilkan warna ungu muda sampai merah muda. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang cukup tebal (20-80 nm) dan terdiri atas 60 sampai 100 persen peptidoglikan (Kristian dkk, 2009).

Dalam identifikasi bakteri dilakukan untuk mengetahui karakteristik dari bakteri tersebut yaitu, pada pengujian katalase dilakukan dengan mengambil isolat dengan ose secara aseptis dari agar miring kemudian digoreskan diatas petridish. Selanjutnya ditetesi 1 tetes H_2O_2 agar aktifitas katalase mikroba dapat diketahui. Kemudian amati ada tidaknya gelembung. Gelembung tersebut terbentuk

menunjukkan bahwa bakteri mampu merombak H_2O_2 menjadi O_2 (Kristian P, 2009). Isolat T yang diuji katalase menunjukkan tidak adanya gelembung yang dihasilkan artinya isolat T memiliki sifat katalase negatif. Salah satu sifat yang merupakan ciri bakteri asam laktat yang tidak memiliki enzim katalase.

Pada uji oksidase digunakan p-aminodimethylaniline. Perubahan koloni menjadi merah menunjukkan pengujian oksidase positif sedangkan warna ungu ketika oksidasenya negatif. Enzim sitokrom oksidase akan bereaksi dengan adanya penurunan oksigen pada akhir rantai transpor elektron. Reagen yang semula tidak berwarna akan mendeteksi adanya enzim oksidase yang bereaksi dengan oksigen dan berubah menjadi berwarna (Kismiyati, 2009). Pengujian pada isolat T menunjukkan sifat oksidase negatif yang merupakan ciri bakteri asam laktat.

Motilitas isolat T diuji dengan menusukkan isolate pada medium MIO agar tegak dengan menggunakan ose lurus. Uji MIO terdiri dari motil untuk melihat pergerakan bakteri, indol untuk mengetahui produksi indol dari tryptophane dan ornithin untuk mengamati perubahan warna yang terjadi pada media. Apabila biakan bakteri menyebar dari garis tusuan maka motilitas positif, apabila terjadi perubahan warna menjadi ungu tua maka ornithin positif dan apabila terbentuk cincin merah setelah diberi larutan Kovacs' maka indol positif (Nadia H, 2011). Bakteri T menunjukkan hasil negatif pada ketiga aspek tersebut. Kemampuan motilitas yang rendah ini mendukung bahwa bakteri T adalah bakteri asam laktat dimana sifat motilitas bakteri asam laktat sangat rendah sampai tidak sama sekali.

Uji OF (Oksidatif/Fermentatif) digunakan untuk menguji metabolisme bakteri oksidatif atau fermentatif. Proses oksidasi terjadi didalam tabung oleh organisme

aerob dan proses fermentasi oleh organisme anaerob. Oksidatif positif jika terjadi perubahan warna pada media sebaliknya jika tidak terjadi perubahan warna maka fermentasi positif (Kismiyati, 2009). Berdasarkan pengamatan yang dilakukan, isolat T melakukan fermentasi karena tidak terjadi perubahan warna sesuai dengan sifat bakteri asam laktat yaitu melakukan fermentasi.

TSIA dan LIA adalah media diferensial dengan indikator pH yang dapat membedakan mikroorganisme berdasarkan kemampuannya dalam memecah karbohidrat spesifik dengan atau tanpa menghasilkan gas. Berdasarkan hal tersebut bakteri dapat digolongkan sebagai mikroba non fermenter, fermenter glukosa, atau fermenter glukosa dan laktosa. Pada TSIA terdapat karbohidrat berupa glukosa, sukrosa, dan laktosa, fenol merah sebagai indikator pH, serta natrium tiosulfat. Sedangkan LIA mengandung glukosa, asam aminolisin, dan brom kresol ungu sebagai pH indikator, serta natrium tiosulfat.

Menurut Nadia R (2011) Uji TSIA merupakan pengujian dengan menggunakan medium *Triple Sugar Iron Agar* yang merupakan metode yang digunakan untuk melihat kemampuan bakteri dalam memfermentasikan gula-gula, selain itu dapat juga digunakan untuk melihat kemampuan bakteri dalam menghasilkan H_2S dan gas dari proses fermentasi. Isolat bakteri diambil dari stok sebanyak 1 ose kemudian diinokulasikan kedalam medium TSIA yang mengandung laktosa, sukrosa, dan glukosa dengan cara ditusukkan kedalam medium tersebut hingga mencapai bagian tegak (*butt*). Selanjutnya diambil 1 ose biakan dan digoreskan pada permukaan media. Diinkubasi pada temperatur $37^{\circ}C$ selama 2x 24 jam dan diamati perubahan warna yang terjadi pada bagian kemiringan dan

kedalaman untuk menunjukkan sifat alkali dan asam. Perubahan warna medium menjadi kuning menandakan asam, warna merah menandakan medium menjadi basa, warna hitam menandakan terbentuknya H_2S dan jika medium terangkat menandakan bahwa mikroba tersebut mampu menghasilkan gas. Hasil yang diperoleh pada isolat T menunjukkan hasil positif pada medium TSIA ini. Hal ini ditandai dengan berubahnya warna media dari merah menjadi kuning baik bagian *slant* maupun *butt* dari media tersebut. Artinya bakteri mampu memfermentasi glukosa, sukrosa dan laktosa. Selain itu, bakteri tidak memproduksi H_2S .

Uji LIA dapat digunakan untuk identifikasi mikroba penghasil enzim yang mampu mende-karboksilasi asam amino lisin membentuk amin kadaverin yang bersifat basa sehingga merubah warna media yang mengandung indikator bromkresol ungu dari coklat menjadi ungu (+) jika tidak mengalami perubahan maka reaksi negatif. Reaksi positif ataupun negatif dapat disertai atau tidak disertai dengan pembentukan gas (Haryani, 2012). Isolat T menunjukkan hasil negatif pada saat ditumbuhkan pada medium *Lysine Iron Agar* artinya isolat T tidak dapat mende-karboksilasi asam amino lisin dan tidak memproduksi H_2S .

Media KIA (*Kliger Iron Agar*) merupakan media diferensiasi yang digunakan menentukan fermentasi karbohidrat dan gas yang diproduksi dari fermentasi. KIA sangat baik digunakan untuk menentukan bakteri gram negatif berbentuk batang dari famili *Enterobacteraceae*. Yang mengalami fermentasi adalah glukosa dan menghasilkan produk yang asam. Di dalam media KIA mengandung gula atau karbohidrat yang akan direaksikan oleh bakteri membentuk suasana asam yang ditandai dengan adanya warna kuning, bakteri lebih mudah mengurai pada media

bagian dasar. Warna kuning terbentuk karena di dalam media mengandung indikator *Phenol Red* dimana dalam suasana asam akan berubah menjadi kuning. Keadaan basa pada medium KIA, ditandai dengan warna media yang tetap merah, atau tidak terjadi perubahan warna. Hal ini terjadi karena karbohidrat atau gula dalam media tidak terurai sehingga suasananya tidak menjadi asam. Gas pada medium ini ditandai dengan adanya bagian yang kosong dari media atau bahkan kadang media dapat terangkat. Hal ini terjadi karena adanya metabolisme dari bakteri yang menghasilkan gas misalnya CO_2 sehingga media akan terdesak oleh gas dan menghasilkan suatu ruangan yang berongga udara atau bahkan bila gas yang dibentuk banyak akan terangkat ke atas. KIA tegak untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan H_2S , sedangkan KIA miring untuk mengetahui aktivitas fermentasi dari bakteri (Wulan Sri U, 2015). Medium KIA yang digunakan pada penelitian ini yaitu medium yang miring. Hasil yang diperoleh adalah positif pada pengujian ini. Hal ini ditandai dengan berubahnya media dari merah menjadi kuning baik pada bagian *butt* maupun *slant* dari media tersebut.

Gelatin adalah suatu zat yang meleleh pada atau di atas 28°C . Hidrolisis gelatin terjadi karena bakteri menghasilkan Media gelatin digunakan untuk menguji apakah bakteri dapat mencerna protein gelatin. Untuk mencerna gelatin, bakteri memerlukan enzim gelatinase. Hasil positif jika setelah dimasukkan kedalam lemari es media memadat. Sebaliknya jika medium tetap mencair maka hasil yang diperoleh negatif (Chairul H, 2012). Uji degradasi gelatin menunjukkan hasil negatif yang artinya bakteri T tidak mempunyai enzim gelatinase.

Pada pengujian terhadap medium urea diperoleh hasil negatif. Artinya isolat T tidak memiliki enzim urease. Medium Urea Broth digunakan untuk menguji aktivitas urease. Urease merupakan enzim hidrolitik yang menyerang ikatan nitrogen dan karbon pada komponen amida misalnya urea dan membentuk alkaline yang produk akhirnya adalah ammonia (Harmatang S, 2014). Tidak adanya ammonia dalam media akan menyebabkan warna indikator berubah menjadi pink tua yang menandakan bahwa bakteri T tidak memiliki enzim urease sehingga dapat dikatakan reaksi ini menunjukkan hasil uji negatif.

Medium SCA (*Simmon Citrate Agar*) merupakan media yang berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memanfaatkan natrium sitrat sebagai sumber karbon untuk keperluan hidupnya. Tanda adanya pertumbuhan bakteri pada medium ini adalah adanya perubahan warna dari hijau menjadi biru dengan adanya indikator *Brom thymol blue* (Harmatang S, 2014). Namun hasil yang diperoleh dari pengujian terhadap isolat T adalah negatif, hal ini menandakan bahwa isolat T tidak mampu mendegradasi natrium sitrat.

Pengujian terhadap medium nitrat digunakan untuk melihat keberadaan senyawa nitrit pada media setelah ditumbuhkan bakteri. Keberadaan nitrit dalam media diuji dengan penambahan asam dan α -naftilamin yang akan bereaksi dengan nitrit yang ditunjukkan dengan perubahan warna media menjadi merah atau merah muda. Pada tabung yang tidak menunjukkan perubahan warna, ditambahkan bubuk Zn untuk melihat reduksi nitrat menjadi nitrit. Bila didapatkan nitrat dalam medium, maka media akan berubah warna menjadi merah muda atau merah karena Zn mereduksi nitrat menjadi nitrit dan nitrit ini bereaksi dengan reagen uji dan terbentuk

warna merah (Defin A, 2012). Hasil yang diperoleh diperoleh bahwa negatif bakteri T dapat menghasilkan nitrit.

Uji malonate digunakan untuk melihat perubahan malonate. Jika terjadi perubahan dari hijau ke biru maka uji positif sedangkan negatif jika tidak terjadi perubahan warna (Wulan Sri U, 2015). Pada uji yang dilakukan untuk isolat T diperoleh hasil negatif karena isolat T tidak dapat mendegradasi asam malonate.

Reaksi isolat T terhadap arginine memberikan hasil positif isolat T dapat menghidrolisis arginin. Hal ini ditandai dengan berubahnya media dari ungu menjadi merah. Perubahan warna media terjadi akibat adanya aktivitas dua enzim yang dihasilkan bakteri yaitu enzim *desmidase* yang berperan mendegradasi arginine menjadi citrulline dan NH_3 serta enzim *citrulline ureidase* yang dapat mengubah citrulline menjadi ornithine, CO_2 dan NH_3 . Reaksi yang terjadi adalah reaksi alkalin dari produksi NH_3 yang terlihat melalui uji ini (Wulan Sri U, 2015). Isolat T menghasilkan kedua enzim tersebut.

Uji MR (*Methyl Red*) dilakukan dengan mengambil sebanyak 1 ose isolat diambil dari stok kemudian diinokulasikan pada medium cair MR-VP. Selanjutnya diinkubasi selama 2 x 24 jam pada temperatur 37°C . Setelah diinkubasi, *Methyl-red* ditambahkan sebanyak 5 tetes diatas preparat isolat bakteri. Hasil positif jika terbentuk kompleks warna pink sampai merah yang menandakan bahwa mikroba tersebut menghasilkan asam. Warna merah yang terbentuk pada media akibat penurunan pH media oleh produk asam dalam jumlah besar yang dihasilkan dari fermentasi glukosa. Dalam proses fermentasi yang melibatkan bakteri asam laktat mempunyai ciri khas yaitu terakumulasinya asam organik yang disertai dengan

penurunan pH (Defin A, 2012). Hasil yang ditunjukkan pada isolat T yaitu positif karena terjadi perubahan warna menjadi merah muda. Hal ini menunjukkan bahwa isolat T dapat memproduksi asam yang diduga asam laktat.

Uji VP (*Voges Proskauer*) dilakukan dengan mengambil Isolat bakteri sebanyak 1 ose dan diinokulasikan kedalam medium cair MR-VP kemudian diinkubasikan pada temperatur 37°C selama 2 x 24 jam. Setelah diinkubasi kemudian ditambahkan 0,2 mL KOH 40% dan 0,6 mL α -naftol pada masing-masing isolat lalu dikocok selama 30 detik. Uji *Voges Proskauer* digunakan untuk menentukan kemampuan bakteri dalam menghasilkan produk akhir yang netral (*acetyl methyl carbinol*) dari fermentasi glukosa (Amalia Krisna D, 2013). Hasil uji menunjukkan hasil negatif terhadap uji VP. Hal ini terlihat dengan tidak ditemukan adanya cincin merah yang terbentuk pada media setelah ditetesi dengan reagen.

Pada pengujian produksi asam yang dihasilkan oleh isolat T pada berbagai karbohidrat, hanya ada empat medium yang positif dihasilkannya asam yaitu glukosa, laktosa, sukrosa dan dekstrosa. Hal ini ditandai dengan berubahnya warna media dari ungu menjadi kuning (Iwan S, 2012). Isolat T menunjukkan hasil negatif pada media uji produksi asam yang lain. Artinya isolat T tidak dapat memproduksi asam pada maltosa, manitol, D-xylose, rhamnosa, trehalose, L-arabinosa, dulcitol, DL-phenylalanine, sorbitol, inositol, raffinosa dan malonat.

Isolat T merupakan bakteri yang bersifat heterofermentatif yang ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung durham di media uji produksi asam pada glukosa, berarti bakteri tersebut mampu memecah glukosa menjadi asam laktat dan senyawa lain yaitu CO₂, etanol, asetal dehid atau diasetil melalui jalur oksidatif

pentosa fosfat dengan bantuan enzim fosfoketolase. Hal ini berarti isolat T dapat memecah glukosa menjadi asam laktat sebagai produk utama melalui jalur *Embden-Meyerhorf-Parnas* (EMP) atau glikolisis. Enzim yang berperan dalam tahap glikolisis adalah enzim aldolase dan heksosa isomerase.

3. Identifikasi Molekuler BAL

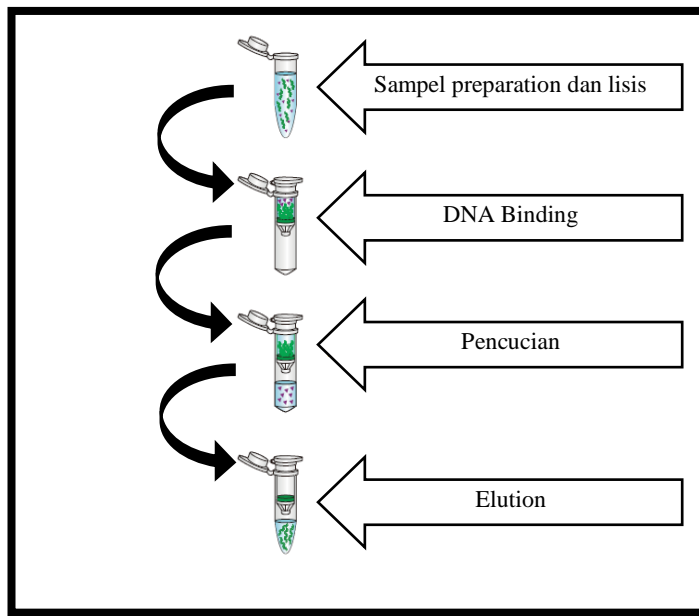
Karakterisasi molekular merupakan karakterisasi dengan menggunakan data molekular. Salah satu data molekular yang digunakan dalam identifikasi mikrobial adalah asam nukleat. Dalam proses identifikasi molekular mikroorganisme, ada 3 proses utama yang paling dasar yaitu ekstraksi, amplifikasi dan elektroforesis. Pada tahap ekstraksi terjadi pemisahan benang-benang DNA dengan komponen sel yang lain (Christina, 2010).

Metode ekstraksi DNA dikembangkan untuk mendapatkan hasil terbaik. Isolasi/ ekstraksi DNA diperoleh dengan cara merusak atau memecahkan dinding sel sehingga DNA keluar dari dalam sel. Pada metode *boiling*, pemanasan tinggi selama beberapa menit akan menyebabkan peningkatan permeabilitas dinding sel yang berakibat pada masuknya cairan dan materi lain di sekitar sel dan keluarnya materi-materi dari dalam sel. Suhu tinggi juga bermanfaat untuk inaktivasi enzim, terutama DN-ase yang dapat merusak DNA. Suhu yang digunakan dan lamanya pemanasan tergantung sampel yang digunakan. Pada penelitian ini, pemanasan dilakukan pada suhu 60°C selama 5 menit seperti yang tertera pada manual prosedur geneaid. Pemanasan dengan suhu terlalu tinggi atau waktu terlalu lama dikhawatirkan akan merusak DNA target dan akan memperlama proses ekstraksi. Ekstraksi DNA menggunakan metode *boiling* sangat mudah dilakukan dan hanya membutuhkan

waktu beberapa menit, tapi kualitas DNA yang dihasilkan relatif lebih rendah dibandingkan dengan metode lain. Hal ini terjadi karena proses pengeluaran DNA tidak sempurna sehingga masih dimungkinkan adanya DNA yang terperangkap dalam sel. Eliminasi partikel lain juga tidak sempurna sehingga dapat menjadi inhibitor pada proses amplifikasi (Sunarno, 2014).

Proses ekstraksi yang dilakukan memacu pada pedoman instruksi manual oleh geneaid dengan menggunakan gSYNCTM DNA Ekstraction Kit. Didalam prosedur manual ini ada beberapa proses penting dalam ekstraksi yaitu preparasi sampel, lisis sel, pengikatan DNA, pencucian dan elusi.

Kit komersial gSYNC DNA Ekstarction Kit menggunakan prinsip mini column atau filtrasi DNA (seperti terlihat pada gambar 4.1). Pertama sel dilisis menggunakan *lysis buffer* (buffer AL). Komponen sel (terutama protein) dihancurkan dengan enzim protease (proteinase K). DNA diendapkan dengan ethanol absolut difilter dan dicuci dengan *washing buffer* (buffer W1). Terakhir, DNA dilarutkan dalam *elution buffer* (buffer AE). Ekstraksi DNA dengan mini column merupakan metode ekstraksi yang paling umum dilakukan karena hasil yang didapatkan sangat baik dalam waktu yang tidak terlalu lama (dibandingkan metode phonol-clorophorm) dan biaya yang lebih murah dibandingkan dengan *magnetic bead*. Meskipun demikian, metode ini memerlukan waktu sekitar 1 jam (cukup lama dibandingkan metode sederhana), menggunakan reagen kimia yang cukup banyak dan biayanya yang lebih banyak dibanding metode sederhana.



(Gambar 4.5. prinsip kerja mini column)

Hasil isolasi genomik DNA kemudian diamplifikasi dengan PCR sebanyak 40 siklus. Dielektroforesis selama 60 menit 100 volt pada gel agarosa dengan konsentrasi 2%. Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan PCR Master Mix (Fermentas) sesuai dengan prosedur yang dianjurkan oleh Fermentas ke dalam tabung mikrosentrifus 0,5 mL dimasukkan 25 μ L PCR mixture yang terdiri dari 25 μ L PCR Master Mix (0,05 U/mL Taq DNA polymerase; 0,4 mM masing-masing dNTP; 4 mM $MgCl_2$), 2 μ L Primer 16E1, 2 μ L Primer 16E2, 1 μ L MilliQ, dan 10 μ L template DNA genomik, dimasukkan ke dalam mesin PCR dan diatur tahap-tahap PCR yaitu denaturasi 94°C, 20 detik; primer annealing 56°C, 20 detik; primer extension 72°C, 30 detik; sebanyak 35 siklus; dan tahap terakhir adalah Final extension 72°C selama 10 menit (Maksum, 2010).

Dari hasil elektroforesis diketahui terdapat pita yang terseparasi dan sejajar dengan marka 1000bp. Hal ini mengindikasikan bahwa fragmen gen yang

teramplifikasi memiliki ukuran 1 elektroforesis ini memiliki ukuran $\pm 1000\text{bp}$, sehingga dapat disimpulkan bahwa proses amplifikasi bakteri berhasil dilakukan (Rina N, 2012). Target yang telah dicapai ini cukup untuk melakukan identifikasi spesies bakteri T tersebut. Selanjutnya, hasil dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia yang kemudian akan dikirim ke 1st BASE sequencing INT di Malaysia untuk pemetaan pasang basa yang berhasil diamplifikasi. Hasil yang diperoleh dari Malaysia selanjutnya dianalisis pada gen bank menggunakan analisis BLAST.

Analisis BLAST dilakukan dengan tujuan untuk membandingkan hasil yang diperoleh dengan hasil sekuen DNA dari seluruh dunia dari hasil yang didepositkan pada database genbank sekuen publik. Analisis BLAST dilakukan secara online pada website NCBI, 2015: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Hendri P, 2012). Ciri-ciri sequens dari gene bank yang paling mirip dengan sequens DNA yang diperoleh yaitu, nilai Max Score dan Total Score sama, Query Coverage mendekati 100%, E-value mendekati 0, dan Max Ident mendekati 100%. Dari kelima parameter tersebut, nilai Query Coverage yang paling penting karena menunjukkan persentase database yang tertutupi oleh Query. Apabila nilai E-Value semakin mendekati nol, hasilnya akan lebih terpercaya dan bila nilainya 1, maka tidak boleh digunakan (Narita V, 2012). Hasil analisis BLAST dari isolat T adalah bakteri *Pediococcus acidilactici* strain JFP1 16S Ribosomal RNA gene partial sequence. Strain ini diambil sebagai hasil yang paling sesuai dengan strain DNA yang diperoleh karena, memiliki nilai Max Score dan Total Score sama yaitu 1740, Query Coverage yang paling mendekati 100% dengan nilai persentase 98%, E-Value sama dengan 0 dan max ident mendekati 100% yaitu 99% (Gambar 4.6). Strain BAL yang diperoleh mulai dari urutan 3 sampai 957

sesuai dengan strain *Pediococcus acidilactici* urutan 573 sampai 1530 (Gambar 4.7). Tanda "|" menunjukkan kecocokan atau match di antara kedua sekuens sedangkan kesenjangan/ gap ditunjukkan dengan tanda "-" yang diasosiasikan dengan proses insersi atau delesi pada bagian tersebut. Sedangkan basa nukleotida yang diganti dengan huruf "N" menandakan bahwa N tersebut bisa digantikan oleh keempat basa yang ada

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Pediococcus acidilactici strain JFP1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1740	1740	98%	0.0	99%	KM062019.1
<input type="checkbox"/>	Pediococcus acidilactici gene for 16S rRNA, partial sequence, strain Ni1001	1735	1735	98%	0.0	99%	AB598949.1
<input type="checkbox"/>	Pediococcus acidilactici strain KLB69-2 16S rRNA gene, complete sequence	1735	1735	97%	0.0	99%	DQ294959.1
<input type="checkbox"/>	Pediococcus lolii strain LMG25667 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1733	1733	97%	0.0	99%	JX311435.1
<input type="checkbox"/>	Pediococcus lolii strain LMG27029 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1733	1733	97%	0.0	99%	JX311434.1
<input type="checkbox"/>	Pediococcus acidilactici strain KLB67-1 16S rRNA gene, complete sequence	1731	1731	97%	0.0	99%	DQ294958.1
<input type="checkbox"/>	Pediococcus acidilactici gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, isolate: VMCU72N	1727	1727	98%	0.0	99%	LC035107.1
<input type="checkbox"/>	Pediococcus acidilactici strain CE73b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1727	1727	97%	0.0	99%	KF057958.1
<input type="checkbox"/>	Pediococcus acidilactici strain CE75b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1727	1727	97%	0.0	99%	KF057953.1
<input type="checkbox"/>	Pediococcus acidilactici strain UL5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1727	1727	97%	0.0	99%	EF059987.1
<input type="checkbox"/>	Pediococcus acidilactici 16S rRNA gene, strain B1104	1727	1727	97%	0.0	99%	AJ305322.1
<input type="checkbox"/>	Pediococcus acidilactici strain DSM 20284 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1727	1727	97%	0.0	99%	NR_042057.1

(Gambar 4.6. Tabel hasil analisis BLAST)

Range 1: 573 to 1530 GenBank Graphics				Next Match	Previous
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1740 bits(942)	0.0	953/958(99%)	3/958(0%)	Plus/Plus	
Query 3	CGGATTTT-TTGGGCGT-AAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTC	60			
Sbjct 573	CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTC	632			
Query 61	GGCTCAACCGAAGAAAGTGCAATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAAGAGAGGACAGTGGG	120			
Sbjct 633	GGCTCAACCGAAGAAAGTGCAATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAAGAGAGGACAGTGGG	692			
Query 121	ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGC	180			
Sbjct 693	ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGC	752			
Query 181	TGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAC	240			
Sbjct 753	TGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAC	812			
Query 241	CCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGT	300			
Sbjct 813	CCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGT	872			
Query 301	GCTGCAGCTAACGCATTAAAGTAATCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA	360			
Sbjct 873	GCTGCAGCTAACGCATTAAAGTAATCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAA	932			
Query 361	AAGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGA	420			
Sbjct 933	AAGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGA	992			
Query 421	AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCCTTCGGG	480			
Sbjct 993	AGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCCTTCGGG	1052			
Query 481	GACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG	540			
Sbjct 1053	GACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG	1112			
Query 541	TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAGTGA	600			
Sbjct 1113	TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAGTGA	1172			
Query 601	GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAGGTGGGAGCAGCTCAAATCATCATGCCCTTATG	660			
Sbjct 1173	GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAGGTGGGAGCAGCTCAAATCATCATGCCCTTATG	1232			
Query 661	ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAAACCGGAGGTTTA	720			
Sbjct 1233	ACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAAACCGGAGGTTTA	1292			
Query 721	GCTAATCTCTTAAACCATTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAAT	780			
Sbjct 1293	GCTAATCTCTTAAACCATTTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAAT	1352			
Query 781	CGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC	840			
Sbjct 1353	CGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC	1412			
Query 841	ACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCTTTTAG	900			
Sbjct 1413	ACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCTTTTAG	1472			
Query 901	GAGCTAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTACAGGGG-TAGACC	957			
Sbjct 1473	GAGCTAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTACAGGGGGTANACC	1530			

Gambar 4.7. Perbandingan urutan basa sampel T dan bakteri *Pediococcus acidilactici*

BAB V

PENUTUP

A. Kesimpulan

Adapun kesimpulan dari penelitian ini yaitu, bakteri asam laktat yang didapatkan dari isolasi pada limbah cair pembuatan dangke (*whey*) berjumlah 1 isolat, dengan kode Isolat T. Morfologi koloninya berbentuk *coccus* dengan coloni berbentuk tetra, berwarna putih-susu, merupakan bakteri gram positif. Sifat dari Isolat T tersebut yaitu katalase negatif, oksidase negatif, motilitas negatif, indol dan ornithin negatif, positif melakukan fermentasi serta tidak menghasilkan H₂S. Hanya melakukan fermentasi pada karbohidrat berupa glukosa, sukrosa, laktosa dan dekstrosa. Serta merupakan bakteri homofermentatif yang tidak menghasilkan produk samping selain asam laktat. Dari hasil identifikasi molekuler diketahui bahwa isolat T yang berhasil dimurnikan merupakan spesies *Pediococcus acidilactici*.

B. Saran

Adapun saran untuk penelitian selanjutnya adalah sebelum melakukan penelitian sebaiknya memahami prinsip-prinsip perlakuan yang akan dilakukan dengan membandingkan referensi-referensi dari berbagai sumber terpercaya seperti buku dan jurnal. Selain itu, lakukan pengerjaan di laboratorium dengan teliti utamanya menjaga kesterilan tempat atau ruangan laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriani, Suryono dan Haris Lukman. *Karakteristik Dadih Susu Sapi Hasil Fermentasi Beberapa Starter Bakteri Asam Laktat Yang Diisolasi dari Dadih Asal Kabupaten Kerinci*. Jambi: Laboratorium Teknologi Hasil Ternak Fakultas Peternakan Universitas Jambi. 2011. Vol . 01 No. 1 September 2011:36-42.
- Antara NS, I Nyoman Dibia dan Wayan Redi Aryanta. *Characterization Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Horse Milk Of Bima*. Yogyakarta: Laboratory of Bioindustri Agroindustrial Technology Faculty of Agricultural Technology Udayana University. 2009.
- Amalia K Dewi. "Isolasi, Identifikasi & Uji Sensivitas *Staphylococcus Aureus* Terhadap Amoxicillin Dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis Diwilayah Grimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. *Jurnal Sain Veteriner*. Vol. 31. No.2 Desember, 2013: 138-150.
- Aris M, Sukenda, Enang Harris, M . Fatuhcri Sukadi, dan Munti Yuhana. *Identifikasi molekular bakteri patogen dan desain primer PCR (Molecular identification of pathogenic bacteria and PCR specific primer design)*. Jakarta: Dosen/Staf Pengajar di Program Studi Budidaya Perairan FPIK-UNKHAIR Ternate, Maluku Utara, Dosen/Staf Pengajar di Departemen Budidaya Perairan FIKP-IPB, Bogor dan Peneliti di Pusat Riset Perikanan Budidaya (PRPB-DKP RI). 2013. Vol. 1 No. 3: 43 – 50.
- Astawana M, Wresdiyati T, I. I. Arief dan E. Suhestia. *Gambaran Hematologi Tikus Putih (Ratus norvegicus) yang Diinfeksi Escherichia coli Enteropatogenik dan Diberikan Probiotik*. Bogor: Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor Departemen Anatomi, Fisiologi dan Farmakologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor. 2011.
- Berthier F and Stanislav D. Ehrlich. *Genetic Diversity Within Lactobacillus Sakei And Lactobacillus Curvatus And Design Of PCR Primers For Its Detection Using Randomly Amplified Polymorphic DNA*. France: Laboratoire de Recherches sur la Viande and Laboratoire de Génétique Microbienne, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert. 1999.
- Biscola V, S.D. Todorov, V.S.C. Capuano, H. Abriouel, A. Gálvez and B.D.G.M. Franco. *Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a Lactococcus lactis strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product*. Brazil: ment of Food and Experimental Nutrition, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 580, Professor Lineu Prestes, 13 B, Sao Paulo, SP, 05508-000, Brazil b Department of Health Sciences, Faculty of Experimental Sciences, University of Jaén, Campus las Lagunillas. 2012.
- Bolotin A, Patrick Wincker, Stéphane Mauger, Olivier Jaillon, Karine Malmare, Jean Weissenbach, S. Dusko Ehrlich and Alexei Sorokin. *The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium Lactococcus lactis ssp. lactis IL1403*.

- France: 1Gé'ne'tique Microbienne, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas Cedex, France; Gé'noscope, Centre National De Sé'quenc'age, Bp 191 91006 Evry Cedex. 2015.
- Chairul huda, Salni & Melki. "Penapisan Aktivitas Antibakteri Dari Bakteri Yang Berasosiasi Dengan Karang Lunak *Sarcophyton* sp". *Jurnal Maspari*, Vol. 4. no.1, 2012: 69-76.
- Cristina L Salala, L Semburing, J Situmorang & Niken S.N.H. "Karakteristik Dan Identifikasi Molekuler (Ardra: Amplifikasi Ribosomal DNA Digestion Analysis) Isolat Bakteri *Bacillus Thuringiensis* Berliner Endogetik Indonesia Sebagai Agensi Pengendali Hayati Hama *Crocidolomia Binotalis* Zell. *Seminar Nasional*. Yogyakarta: Fakultas Pertanian Unsrat, 2010.
- Defin Ari P, Melki, H Surbakti. "Penapisan Bakteri Yang Bersimbiosis Dengan Spon Jenis *Aplysina* sp. Sebagai Penghasil Antibakteri Dari Perairan Pulau Tanjung Lampung. *Jurnal Maspari*, Vol. 4. no. 1, 2012:77-82.
- Delfahedaha Y, Sumaryati Syukurb, Jamsari. *Isolasi, Karakterisasi dan Identifikasi DNA Bakteri Asam Laktat (Bal) yang Berpotensi Sebagai Antimikroba dari Fermentasi Kakao Varietas Hibrid (Trinitario)*. Padang: Laboratorium Bioteknologi, Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Andalas dan Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Andalas. 2013. *Volume 2 Nomor 2, Mei 2013*.
- Dewa FAT, Saifuddin Sirajuddin dan Hendrayati. *Pengaruh Konsentrasi Getah Pepaya Terhadap Kualitas Dangke Dan Daya Terima Masyarakat Effect Of Concentration On The Quality Of Papaya Latex Dangke And Receive Power Community*. Makassar: Prodi Ilmu Gizi Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Hasanuddin. 2010.
- Dharmayanti I. *Kajian Biologi Molekuler: Gen Suppressor Tumor (P53) Sebagai Target Gen dalam Pengobatan Kanker*. Bogor: Balai Penelitian Veteriner. 2003. *WARTAZOA Vol. 13 No. 3 Th. 2003*.
- Faafa JA. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Dangke Asal Kabupaten Sinjai Sulawesi Selatan*. Bogor: Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. 2014.
- Fatchiyah dan Estri Laras Arumingtyas. *Kromosom, Gen, DNA, Sintesis Protein dan Regulasi*. Malang: Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler Universitas Brawijaya. 2006.
- Fatma, Soeparno, Nurliyani, Chusnul Hidayat dan Muhammad Taufi. *Optimasi Kondisi Fermentasi Whey Dangke Sebagai Produk Minuman dengan Response Surface Methodology*. Yogyakarta: Universitas Gajah mada. 2012.
- Febriasantosa A, Bagus Priyo Purwanto, Irma Isnafia Arief dan Yantyati widyastuti. *Karakteristik Fisik, Kimia, Mikrobiologi Whey Kefir dan Aktifitasnya Terhadap Penghambatan Angiotensin Converting Enzyme (ACE)*. Bogor: Program Studi Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan,

Institut Pertanian Bogor, Departemen Ilmu Produksi dan Teknologi Peternakan, Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor dan Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. 2013. Vol. 24 No. 2 Th. 2013.

- Felix F, Titania T Nugroho, Sila Silalahi, and Yuslina Octavia. *Screening Of Indonesian Original Bacteria Vibrio Sp As A Cause Of Shrimp Diseases Based On 16s Ribosomal Dna-Technique*. Riau: Marine Microbiology Laboratory, Department of Marine Science, Faculty of Fishery and Marine Science, University of Riau and Biochemistry Laboratory, Faculty of Science and Mathematics, University of Riau. 2011. Vol. 3, No. 2, Hal. 85-99, Desember 2011.
- Eni Harmayani, Endang S. Rahayu, Titiek F. Djaafar, Citra Argaka Sari dan Tri Marwati. *Pemanfaatan Kultur Pediococcus Acidilactici F-11 Penghasil Bakteriosin Sebagai Penggumpal Pada Pembuatan Tahu*. Yogyakarta: Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta dan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian Bogor. 2009.
- Hartati Y W, Sabarni Gaffar dan Iman Permana Maksum. *Isolasi dan karakterisasi gen pengode fruktosil transferase (ftf) dari bakteri asam laktat susu fermentasi di kabupaten garut*. Bandung: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Padjadadjaran. 2007.
- Hayani Y, Dhainulfiffah & Rustiana. “ Fermentasi Karbohidrat Oleh Isolate *Salmonella* Spp Dwi Jayanan Pinggir Jalan. *Jurnal Ind.Che.Acta*, Vol.3. No. 1 November 2012: 23-25.
- Hendri P. “Identifikasi DNA Dan Gen Resisten Terhadap Virus AL (Avian Influenza) Pada Itik Pitalah Sebagai Sumber Daya Genetic Sumatra Barat Dengan PCR (Polymerase Chain Reaction). *Artikel*. Padang: Program Pascasarjana Universitas Andalas, 2012.
- I Putu Kompiang. *Pemanfaatan Mikroorganisme Sebagai Probiotik Untuk Meningkatkan Produksi Ternak Unggas Di Indonesia*. Bogor: Pusat Penelitian dan Pengembangan Peternakan Jalan Raya Pajajaran. 2009.
- Isyana F. *Studi Tingkat Higiene dan Cemaran Bakteri Salmonella Sp pada Pembuatan Dangke Susu Sapi di Kecamatan Cendana Kabupaten Enrekang*. Makassar: Program Studi Teknologi Hasil Ternak Jurusan Produksi Ternak Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. 2012.
- Iwan S. “Viabilitas Dan Patogenitas *Edwardsiella Tarda* Pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias Gariepinus*) Yang Dibekukan Pada Suhu -20°C”. *Skripsi*. Jakarta: Program Pascasarjana Megister Universitas Terbuka, 2012.
- Kav K and Osman Erganis. *Konya Bolgesinde Bulunan Gokkusaci Alaballgi (Onchyrnus Mykiss) C iftli K Lerinden Lactococcus Garvieae Izolasyonu, Identifikasyonu Ve F Enotipik Ozelliklerinin Belirlenmesi*. Konya: Isolation,

- Identification and Phenotypic Characterization of *Lactococcus garvieae* from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fisheries in Konya Region. 2007.
- Kesuma FMV, Suranto Moch Sayuthi, Ahmad N Al-Baarri dan Anang M Legowo. *Karakteristik Dangka dari Susu dengan Waktu Inkubasi Berbeda Pasca Perendaman dalam Larutan Laktoferin*. Semarang: Program Studi Peternakan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro. 2013.
- Kismiyati. "Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Gram Negative Pada Luka Ikan Maskoki (*Carassius Auratus*) Akibat Infestasi Ektoparasit *Argulus* Sp. *Jurnal Ilmiah Perikanan & Kelautan*, Vol. 1 No. 2 November, 2009: 129-134.
- Kristian P, Elok Z & Ella S. "Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Sayur Kubis Yang Memiliki Kemampuan Penghambatan Bakteri Patogen (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* & *Salmonella typhimurium*). *Jurnal Teknologi Pertanian*, Vol. 10. No. 1 April, 2009: 19-27.
- Kusmawati A, Endang Sri Heruwati, Tyas Utami dan Endang Sutriswati Rahayu. *Pengaruh Penambahan *Pediococcus Acidilactici* F-11 Sebagai Kultur Starter Terhadap Kualitas Rusip Teri (*Stolephorus* Sp.)*. Jogjakarta: Peneliti Pada Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Balitbang KP, KKP dan Dosen Pada Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gajah Mada. 2011. Vol. 6. No. 1, Juni 2011.
- Langga IF, Muh. Restu dan Tutik Kuswinanti. *Optimalisasi Suhu dan Lama Inkubasi dalam Ekstraksi DNA Tanaman Bitter Melon (*Melocrotium* Reinw) Serta Analisis Keragaman Genetik dengan Teknik Rapid-Pcr*. Makassar: Program Studi Sistem-Sistem Pertanian Program Pascasarjana. 2012. Vol.12 No.3 : 265 – 276.
- Lukman RAA. *Perbandingan Efektifitas Metode CTAB – Porebski dan Metode CTAB-Tanaka dalam Isolasi DNA Daun Melinjo (*Gnetum Gnemon* L)*. Jogjakarta: Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Sunan Kalijaga. 2010.
- Maksum R, Anglia P & Atiek S. "Deteksi Cepat Bakteri *Escherichia coli* Dalam Sampel Air Dengan Metode Polymerase Chain Reaction Menggunakan Primer 16E1 Dan 16E2. *Jurnal Makara Sains*, Vol. 14. No. 1 April, 2010: 39-43.
- Malik A, Ajitya Kurnia Hermawati, Mahardhika Hestiningtyas, Atiek Soemiati dan Maksum Radji. *Isolasi Dan Skrining Molekuler Bakteri Asam Laktat Pembawa Gen Glukansukrase dari Makanan dan Minuman Mengandung Gula*. Depok: Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Departemen Farmasi, FMIPA. 2010. VOL. 14, NO. 1, APRIL 2010: 63-68.
- Maryana D. *Pengaruh Penambahan Sukrosa Terhadap Jumlah Bakteri dan Keasaman Whey Fermentasi Dengan Menggunakan Kombinasi *Lactobacillus Plantarum* dan *Lactobacillus Acidophilus**. Makassar: Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. 2014.

- Moraes PM, Luana Martins Perin, Abelardo Silva Júnior dan Luís Augusto Nero. *Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria*. Brazil: Departamento de Veterinaria, Universidade Federal de Vicosa, Vicosa, MG. 2013.
- Muh. Aris, Sukenda, Enang Harris, M. Fatuhcri Sukadi dan Munti Yuhana. *Identifikasi molekular bakteri patogen dan desain primer PCR (Molecular identification of pathogenic bacteria and PCR specific primer design)*. Maluku Utara: Pusat Riset Perikanan Budidaya (PRPB-DKP RI) Jakarta. 2013. Vol. 1 No. 3: 43 – 50.
- Mujnisa A , Laily A. Rotib, Natsir Djide dan Asmuddin Natsir. *Ketahanan Bakteri Asam Laktat Hasil Isolasi Dari Feses Broiler Terhadap Kondisi Saluran Pencernaan Broiler*. Makassar: Fakultas Peternakan Universitas Hasanuddin. 2013.
- Muzaifa M. *Identifikasi Bakteri Asam Laktat Indigenous dari Belimbing Wuluh (Averrhoa Bilimbi L.)*. Aceh: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala. 2014.
- Nadia R. “Profil Kultur Dan Uji Sensivitas Bakteri Aerob Dari Infeksi Luka Operasi Laparatoani Di Bangsal Bedah RSUP DR.M. Djamil Padang. *Artikel*. Padang: Program Pascasarjana Universitas Andalas, 2011.
- Narita V, Arif Lelono Arum, Siti Isnaeni M dan Nuri Y. Fawzya.. *Analisis Bioinformatika Berbasis WEB untuk Eksplorasi Enzim Kitosanase Berdasarkan Kemiripan Sekuens*. Jakarta: Program Studi Biologi (Bioteknologi), Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Al Azhar Indonesia, Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Kementerian Kelautan dan PerikananPusat Teknologi Farmasi dan Medika, Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi. 2012. Vol. 1, No. 4, September 2012.
- Nendissa SJ. *Pengaruh Penambahan Pediococcus Acidilactici F11 Sebagai KulturStarter Terhadap Kualitas Ikan Asin (Ina Sua) Bae (Lutjanus Malabaricus)*. Ambon: Pusat Penelitian Lingkungan Hidup dan Sumberdaya Alam (Pplh – Sda) Universitas Pattimura. 2013. Vol. 02, No. 01. Februari 2013.
- Nur F. *Isolation Of Lactic Acid Bacteria As A Potential Probiotic In Dangke, A Traditional Food From Buffalo Milk In Curio The District Of Enrekang*. Enrekang: Biology Department Faculty of Science and Technology State Islamic University Alauddin. 2013.
- Nur Indah O, Liliek S & Arifin N.S. “Analisis Kekerabatan Mentimun (*Cucunius Sativus L*) Menggunakan Metode RAPD-PCR Dan Isozim”. *Jurnal Biodiversitas*, Vol. 9. no.2 April, 2008: 99-102.
- Nuraeni E. *Karakteristik Koumiss Probiotik Susu Kambing Dengan Penambahan Ekstrak Rosella (Hibiscus Sabdariffa L)*. Bogor: Departemen Ilmu Produksi

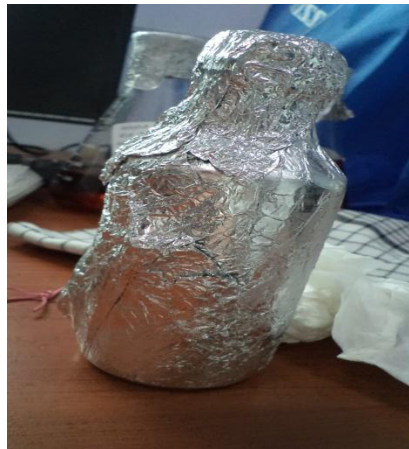
- Dan Teknologi Peternakan Fakultas Peternakan Institut Pertanian Bogor. 2013.
- Nurhayati, Betty Sri Laksmi Jenie, Harsi D. Kusumaningrum dan Sri Widowati. *Identifikasi Fenotipik dan Genotipik Bakteri Asam Laktat asal Fermentasi Spontan Pisang var. Agung Semeru (Musa paradisiaca formatypica)*. Jawa Timur: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, Departemen Ilmu dan Teknologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor dan Peneliti Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Departemen Pertanian. 2011. Vol. 12 No. 2. 2011 : 210 – 225.
- Nuroniya T dan Surya Rosa Putra. *Identifikasi Spesies Isolat Bakteri S1 dengan Metode Analisa Sekuen Fragmen Gen 16s Rdna*. Surabaya: Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS). 2012. Vol. 1, No. 1, (2012) 1-6
- Pharmawati M. *Optimalisasi ekstraksi DNA dan pcr-rapd pada grevillea spp. (proteaceae)*. Bali: Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana dan Kampus Bukit Jimbaran Bali. 2009.
- Purwati E, S. Syukur, Husmaini, Hendri Purwanto dan Reno Permatasari Pasaribu. *Molekulbr Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Isolat Dadih Air Dii{Gin Kabupaten Solok Sumatera Barat*. Padang: Laboratorium Teknologi Hasil Ternak Bioteknologi Fakultas Peternakan Universitas Andalas, Padang, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas. 2014
- Rahayu ES. *Lactic Acid Bacteria and Their Role in Food and Health Current Research in Indonesia*. Jogjakarta: Faculty of Agricultural Technology, Gadjah Mada University Bulaksumur. 2010.
- Rahman S. *Studi Pengembangan Dangke Sebagai Pangan Lokal Unggulan Dari Susu Di Kabupaten Enrekang*. Makassar: Agribisnis Fakultas Pertanian Universitas Islam Makassar. 2013.
- Rahmawati A. *Total Bakteri Asam Laktat (Bal), Kadar Laktosa dan Keasaman Whey Yang Difermentasi dengan Bifidobacterium Bifidum Pada Lama Inkubasi Yang Berbeda*. Semarang: Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. 2010.
- Rina N.P, Ibnu Dwi B & Evi L. “Aplikasi Polymerase Chain Reaction (PCR) konvensional Dan Real Time PCR Untuk Deteksi White Spot Syndrome Virus Pada Kepiting. *Jurnal Perikanan & Kelautan*, Vol. 3. no. 4 Desember, 2012: 61-74.
- Romadhon, Subagiyo dan Sebastian Margino. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Usus Udang Penghasil Bakteriosin Sebagai Agen Antibakteria Pada Produk-Produk Hasil Perikanan*. Jogjakarta: Staf Pengajar Program Studi Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan

- Universitas Diponegoro, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro. 2012.
- Sabdon A dan Ocky Karna Radjasa. *Karakterisasi Molekuler Bakteri yang Berasosiasi dengan Penyakit BBD (Black Band Disease) pada Karang Acropora sp di Perairan Karimunjawa*. Semarang: Department of Marine Science, Diponegoro University. 2006 September 2006. Vol. 11 (3) : 158 – 162.
- Saleh E. *Teknologi Pengolahan Susu dan Hasil Ikutan Ternak*. Sumatra Utara: Program Studi Produksi Ternak Fakultas Pertanian . 2004.
- Sari YNM, Sumaryati Syukur dan Jamsari. *Isolasi, Karakterisasi, dan Identifikasi DNA Bakteri Asam Laktat (BAL) yang Berpotensi Sebagai Antimikroba dari Fermentasi Markisa Kuning*. Universitas Andalas: Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman. 2013. Volume 2 Nomor 2, Mei 2013.
- Sarkono, Faturrahman and Yayan Sofyan. *Isolation And Identification Of Lactic Acid Bacteria From Abalone (Haliotis Asinina) As A Potential Candidate Of Probiotic*. WestNusa Tenggara: Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Mataram University. 2010.
- Septiarini E W, Masdiana C. Padaga dan Dyah A. Oktaviane. *Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat (BAL) yang diisolasi dari feses Orangutan (Pongo pygmaeus) terhadap Penghambatan Pertumbuhan Bakteri Enterik Patogen secara In Vitro*. Universitas Brawijaya: Program Studi Pendidikan Dokter Hewan. 2010.
- Sitti Harmatang. “Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Simbion Pada Cacing Tanah *Pheretima* Sp Dari Berbagai Substrat. *Skripsi*. Makassar: Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin Makassar, 2014.
- Soedigdo R. *Tinjauan Ulang mengenai Biokimia dan RNA Serta Biosintesa Protein*. Bandung: Seksi Biokimia, Ilmu Pengetahuan Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Alam, Institut Teknologi Bandung. 1973.
- Suardana I W, I Nyoman Suarsana, I Nengah Sujayadan Komang Gede Wiryawan. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat dari Cairan Rumen Sapi Bali sebagai Kandidat Biopreservatif*. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Laboratorium Biosain dan Bioteknologi Universitas Udayana, Laboratorium Ilmu Hayati, Pusat Antar Universitas Institut Pertanian Bogor. 2007.
- Sunarno, Fauzul M, Nyoman F, Amaulla M, Anis K & Amin S. “Metode Cepat Ekstraksi DNA *Corynebacterium diphtheria* Untuk Pemeriksaan PCR. *Jurnal Bul. Penelit. Kesehat*. Vol. 42. no.2 Juni, 2014:85-92.
- Sudiarta IW. *Isolasi dan Identifikasi Bakteri Asam Laktat Indigenus dari Kecap Ikan Lemuru (Sardinella Longiceps) Selama Fermentasi*. Bali: Program Studi Bioteknologi Pertanian Program Pascasarjana Universitas Udayana. 2011.
- Sunarno, Aulia Rizki, Kambang Sariadji, Amarila Malik, Anis Karuniawati dan AminSoebandrio. *Direct Polymerase Chain Reaction: Sebuah Alternatif*

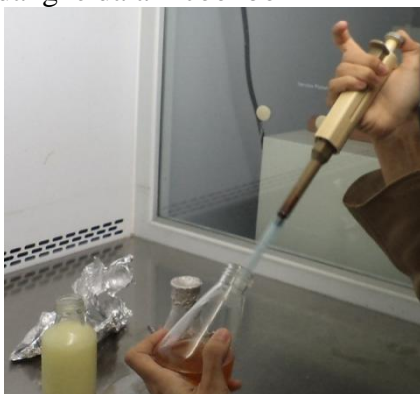
- Metode Diagnostik Difteri Secara Cepat, Mudah dan Hemat*. Jakarta: Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan, Badan Litbangkes, Kemenkes RI. 2013. Vol. 17(2): 88-94.
- Sunarno, Fauzul Muna¹, Nyoman Fitri, Amarila Malik, Anis Karuniawati dan Amin Soebandrio. *Metode Cepat Ekstraksi DNA Corynebacterium Diphtheriae untuk Pemeriksaan Pcr*. Jakarta: Universitas Indonesia. 2014. Vol. 42, No. 2, Juni 2014: 85 – 92.
- Suryani Y, Astuti, Bernadeta Oktavia dan Siti Umniyati. *Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat dari Limbah Kotoran Ayam Sebagai Agensi Probiotik dan Enzim Kolesterol Reduktase*. Jogjakarta: Universitas Negeri Jogjakarta. 2010.
- Suryanto D. *Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler*. Sumatra Utara: Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara. 2003.
- Suwanto A. *Bioteknologi Molekuler. Mengoptimalkan Manfaat Keanekaan Hayati Melalui Teknologi DNA Rekombinan*. Bogor: Jurusan Biologi FMIPA IPB. 1998. Vol. 5. No.1.
- Syafaruddin dan Tri Joko Santoso. *Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA yang Efisien dan Efektif pada Kemiri Sunan (Reutalis Trisperma (Blanco) Airy Shaw)*. Bogor: Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. 2011.
- Trisna WN. *Identifikasi Molekuler dan Pengaruh Pemberian Probiotik Bakteri Asam Laktat (BAL) Asal Dadih dari Kabupaten Sijunjung Terhadap Kadar Kolesterol Daging pada Itik Pitalah Sumber Daya Genetik Sumatera Barat*. Padang: Pascasarjana Universitas Andalas. 2012.
- Umam MF, Rohula Utami dan Esti Widowati. *Kajian Karakteristik Minuman Sinbiotik Pisang Kepok (Musa Paradisiaca Forma Typical) dengan Menggunakan Starter Lactobacillus Acidophillus Ifo 13951 dan Bifidobacterium Longum Atcc 15707*. Bandung: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Sebelas Maret. 2012. Jurnal Teknosains Pangan Vol 1 No 1 Oktober 2012.
- Usmiati S, W. Broto dan H. Setiyanto. *Karakteristik Dadih Susu Sapi yang Menggunakan Starter Bakteri Probiotik*. Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian. 2011.
- Usmiati S Dan W.P. Rahayu. *Aktivitas Hambat Bubuk Ekstrak Bakteriosin dari Lactobacillus Sp. Galur Scg 1223*. Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian dan Departemen Ilmu Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor. 2011.
- Utama A. Peranan Bioinformatika dalam Dunia Kedokteran. Ilmu Komputer: Artikel Populer Ilmu Komputer. 2003.

- Wikandari PR, Suparmo, Yustinus Marsono dan Endang Sutriswati Rahayu. *Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Proteolitik pada Bekasam*. Jogjakarta: Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Surabaya dan Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Gadjah Mada. 2012.
- Wulan Sari U. “Bakteri Asosiasi Karang Yang Terinfeksi Penyakit Brown Band (BRB) Di Perairan Pulau Barang Lompo Kota Makassar. *Skripsi*. Makassar: Fakultas Ilmu Kelautan Dan Perikanan Universitas Hasanuddin Makassar, 2015.
- YulianaN. *Perubahan Karakteristik Biokimia Fermentasi Tempoyak Menggunakan Pediococcus Acidilactici Pada Tiga Tingkat Konsentrasi Gula*. Lampung: Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Vol. 27, No. 2 Juni 2007.
- Yulneriwarni. *Bakteri Asam Laktat Sebagai Fermentatif, Biopreservatif Dan Probiotik*. Universitas Nasional: Fakultas Biologi. 2006.
- Zhao R, Sui Zheng, Cuicui Duan, Fei Liu, Lijie Yang and Guicheng Huo. *NAD-dependent lactate dehydrogenase catalyses the first step in respiratory utilization of lactate by Lactococcus lactis*. China: Key Laboratory of Dairy Science, Northeast Agricultural University, China b Food Processing Institute and Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences. 2013.

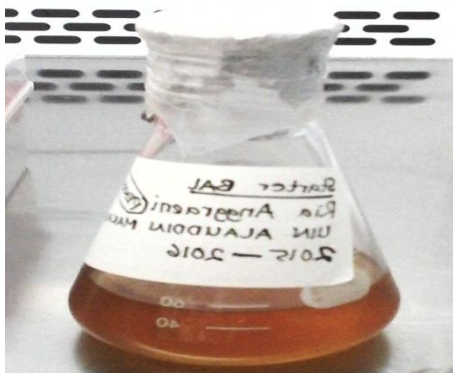
Lampiran 1. Persiapan pembuatan starter BAL *whey* dangke



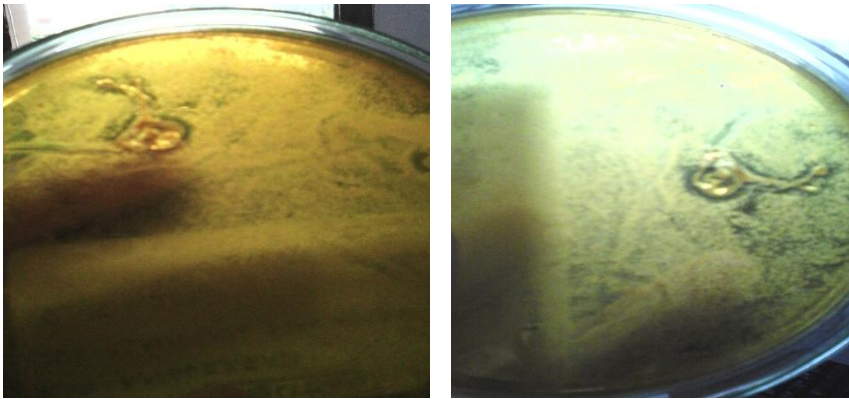
Pengambilan Sampel *whey* dangke dalam cool box



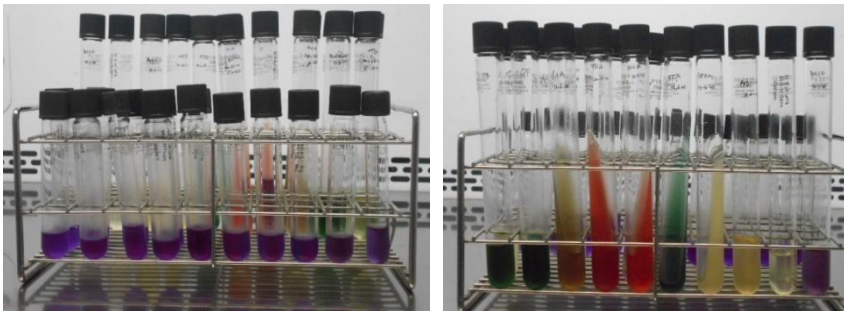
Memasukkan *whey* dangke ke dalam media cair MRSB



Starter BAL yang telah diinkubasi 24 jam dan diisolasi pada media padat MRSA



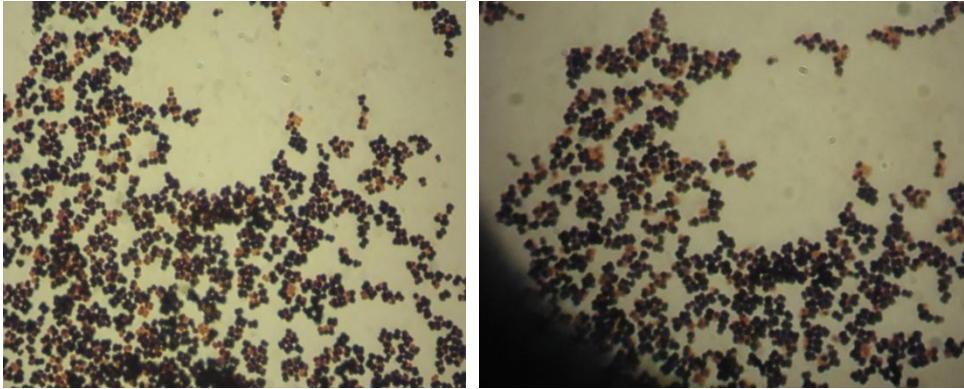
Bakteri yang tumbuh setelah inkubasi 48 jam



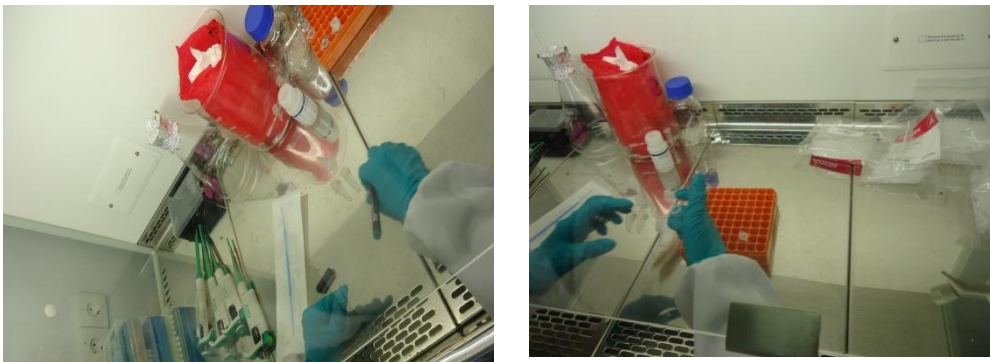
Uji biokimia pada bakteri yang didapatkan dari *whey* dangke inkubasi 24 jam



Pewarnaan gram pada bakteri *whey* dangke



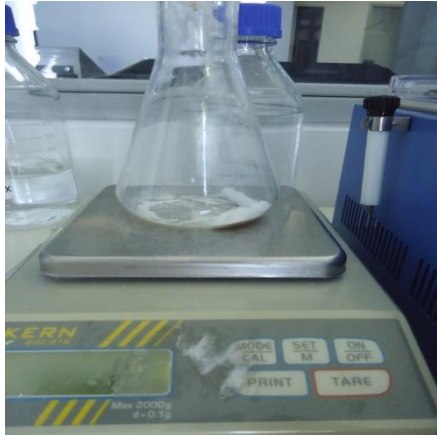
Bakteri dari *whey* dangke gram positif (100x0,24)
Lampiran 2. Persiapan molekuler



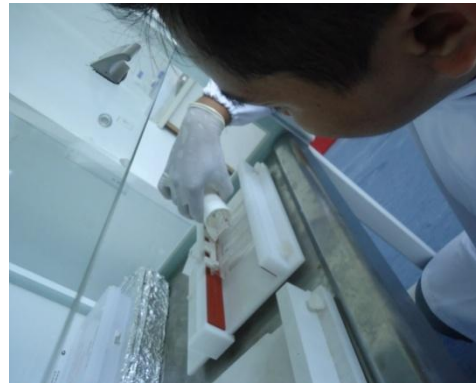
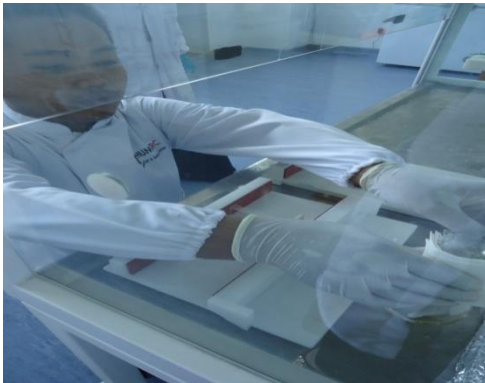
Menyiapkan segala bahan yang diperlukan



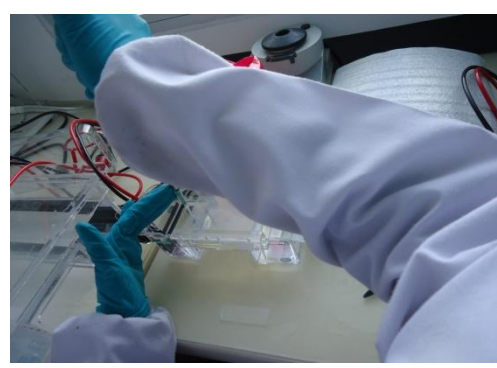
Melakukan molekuler



Membuat agar ros untuk elektroforesis



Pencetakan agar ros



Elektroforesis dan pemasukan reagen ke dalam sumur agar ros

DAFTAR RIWAYAT HIDUP



Tias Praditya Putra, lahir di Rappang Kabupaten Sidrap, Sulawesi Selatan, pada tanggal 23 November 1993. Penulis merupakan anak ke-1 dari 7 bersaudara dari pasangan Ayahanda **Drs. Aslang** dan Ibunda **Dra. Nurhayati**, yang telah menempuh jalur pendidikan sebagai berikut:

1. Sekolah TK Aisyah Rappang pada tahun 1999-2001.
2. Sekolah Dasar (SD) Negeri 122 Daulloloe pada tahun 2001-2006.
3. Sekolah Menengah Pertama (SMP) Negeri 1 Wotu 2006-2008.
4. Sekolah Menengah Atas (SMA) Negeri 1 Wotu 2008-2011.
5. Pada tahun 2011, penulis melanjutkan pendidikan pada tingkat perguruan tinggi, Program Strata Satu (S1) pada Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Alauddin Makassar, melalui jalur Ujian Masuk Lokal (UML).

Selama menempuh jalur pendidikan pada perguruan tinggi, penulis tercatat aktif mengikuti seminar tingkat jurusan dan seminar tingkat universitas, selain itu penulis pernah tercatat menjadi pengurus Himpunan Mahasiswa Jurusan Biologi pada tahun 2011-2014 dan penulis tercatat pula pernah menjadi asisten praktikum dengan mata kuliah; Biologi dasar, Morfologi Tumbuhan, Fisiologi Hewan, Taksonomi Invertebrata, Zoologi Vertebrata, Struktur Hewan, Reproduksi dan Embriologi, Mikrobiologi Umum, Genetika dan Molekuler.